

**Verfahrenstechnische und kinetische Aspekte der Renaturierung
des humanen Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) aus
Einschlußkörpern rekombinanter *Escherichia coli***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Carsten Müller
aus Wilhelmshaven

1. Referent:	Prof. Dr. W.-D. Deckwer
2. Referentin:	Privatdozentin Dr. U. Bilitewski
eingereicht am:	28.05.1998
mündliche Prüfung (Disputation) am:	22.07.1998
Druckjahr:	1998

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Patent

U. Kärst, C. Müller, U. Rinas, H. A. Weich, H. Erdmann; Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cysteinknoten-Familie sowie Verwendung der gewonnenen Dimere; Deutsche Patentanmeldung 197 48 734.3; 1997

Kongreßbeiträge

C. Müller, W.-D. Deckwer, U. Rinas; Produktion des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) im Hochzelldichteverfahren (1996); DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 21.-23.Mai, Wiesbaden; Poster D.05

C. Müller, W.-D. Deckwer, U. Rinas; Production of platelet derived growth factor by means of high-cell density cultivation (1996); 1st European Symposium on Biochemical Engineering Science 19.-21.September, Dublin; Poster 101

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1994 bis April 1998 im Bereich Bioverfahrenstechnik an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W.-D. Deckwer angefertigt, dem ich für das aktuelle und interessante Thema zur Verfahrenstechnik und Theorie der Proteinfaltung sowie für die wohlwollende Unterstützung danke.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. U. Bilitewski (GBF, Braunschweig) für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Rinas für die engagierte fachliche Betreuung dieser Arbeit sowie die wertvollen Anregungen und intensiven Diskussionen.

Frau Dipl.-Biotechnol. Susanne Richter und Herrn cand.-Biotechnol. Olaf Langer danke ich für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Studienarbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prozeßentwicklung danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die vielen kleinen und großen Hilfeleistungen, insbesondere Sabine Marten, Michael Schmidt, Anke Kayser, Karsten Hellmuth, Anne Francoise Mayer, David Estapé, Tanja Oswald, Frank Hoffmann, Detlev Siedenberg und Hesham el Enshasy.

Für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich Herrn Dr. H. A. Weich (biol. Aktivitätstest), Herrn Dr. F. B. Anspach (Chromatographie), Frau Dr. D. Petsch (Endotoxintest), Herrn Dr. M. Kieß und Frau Getzlaff (Aminosäuresequenzierung), Frau Dr. A. H. Rüdiger (MALDI-MS), Herrn Dr. J. van den Heuvel danken sowie Herrn Prof. Dr. J. E. G. McCarthy für die Überlassung der eingesetzten Plasmide.

Weiterhin möchte ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern des Bereiches Bioverfahrenstechnik für das angenehme Arbeitsklima und die von allen Seiten erfahrene Unterstützung bedanken, insbesondere Dr. Schmömann, Dr. Döner, Ulrich Kies, Steffi Heiber, Axel Schulz, Frau Ruffer und Frau Asmus (Sekretariat).

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Frau Gabriele Forndran und meinen Eltern für die mir jederzeit entgegengebrachte Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
Zielsetzung der Arbeit	5
2. Theoretische Grundlagen	6
2.1 PDGF (platelet-derived growth factor)	6
2.1.1 Allgemeines	6
2.1.2 Das Molekül	6
2.1.3 Gewinnung von PDGF	9
2.2 Proteinfaltung	11
2.2.1 Grundlagen	11
2.2.2 Bildung von Disulfidbrücken	12
2.2.3 Assoziation	13
2.2.4 Nebenreaktionen	15
2.2.5 Mechanismen, Modelle	16
2.2.5.1 Grundmodell	16
2.2.5.2 Erweiterte Modelle	18
2.2.6 Bedeutung für PDGF	21
2.3 Verfahren zur Renaturierung	22
2.4 Theorie der Gelfiltration	25
2.5 Theorie der Fluoreszenzeigenschaften von Proteinen	26
2.6 Mathematische Ansätze zur Kinetik	27
2.6.1 Geschwindigkeitsgesetze	27
2.6.2 Bestimmung der Reaktionsordnung	29
2.6.2.1 Graphische Auftragung	29
2.6.2.2 Die Umsatzmethode	29
2.6.2.3 Die Differentialmethode	30
2.6.3 Gleichgewichtsreaktionen	31
2.6.4 Aggregationsreaktionen	32
2.6.5 Konzentrationsanaloge Größen	33
3. Material und Methoden	35
3.1. Produktion von PDGF	35
3.1.1 Mikroorganismus und Vektorsystem	35
3.1.2 Stammhaltung	35
3.1.3 Kultivierung	36
3.2 Primäraufarbeitung von PDGF	38
3.2.1 Zellaufschluß und Separation der Einschußkörper	38
3.2.2 Extraktion kontaminierender Proteine	38
3.2.3 Solubilisierung der Einschußkörper	39

3.3 Chromatographie	39
3.3.1 Gelfiltration	39
3.3.1.1 Reinigung von PDGF unter denaturierenden Bedingungen	39
3.3.1.2 Renaturierung von PDGF	40
3.3.2 Feinreinigung von PDGF	41
3.4 Konzentrieren und Umpuffern	41
3.5 Derivatisierung der Cysteinreste	42
3.6 Analytik	42
3.6.1 Analytik zur Hochzelldichtekultivierung	42
3.6.2 Proteinanalyse	43
3.6.2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.6.2.2 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-SDS-PAGE)	44
3.6.2.3 Blotting	45
3.6.2.4 Aminoterminal Sequenzierung	45
3.7 Fluoreszenzspektrometrie	45
3.7.1 Stammlösungen	46
3.7.2 Standardbedingungen	46
3.7.3 Kinetische Messungen	47
3.7.3.1 Dimerisierung	47
3.7.3.2 Renaturierung nach der Verdünnungsmethode	47
3.8 Streulichtmessung	47
3.9 Charakterisierung von PDGF	48
3.9.1 MALDI-Massenspektroskopie	48
3.9.2 Biologischer Aktivitätstest	48
3.9.3 Untersuchung auf Endotoxine (LAL-Test)	49
4. Ergebnisse und Diskussion	50
4.1 Reinigung solubilisierter PDGF-Einschlußkörper	50
4.2 Renaturierung von PDGF mittels Gelfiltration	52
4.2.1 Chromatographische Aspekte der Renaturierung von PDGF	55
4.2.1.1 Zusammensetzung des Eluats	55
4.2.1.2 Effekt der Renaturierungsparameter auf die Wiederfindung der Monomere	56
4.2.1.3 Renaturierung verunreinigter PDGF-Einschlußkörper	58
4.2.2 Untersuchung der Dimerisierung mittels SDS-PAGE	60
4.2.2.1 Kinetik der Dimerisierung	60
4.2.2.2 Bestimmung der Reaktionsordnung	62
4.2.2.3 PDGF-Isoformen	65
4.2.2.4 Einflußgrößen	68
4.2.2.4.1 Temperaturabhängigkeit	68
4.2.2.4.2 Gnd-HCl	71
4.2.2.4.3 Redoxbedingungen	73
4.2.2.5 Natur des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes	76
4.2.2.6 Nebenreaktionen	79
4.2.2.6.1 Gleichgewichtseinstellung	79
4.2.2.6.2 Aggregation	80

4.2.2.6.3 Unkorrekt gefaltete Intermediate	81
4.2.3 Untersuchung der Dimerisierung mittels Fluoreszenzspektrometrie	85
4.3 Renaturierung von PDGF mittels Verdünnung	86
4.3.1 Fluoreszenzspektrometrische Analyse der Renaturierung von PDGF durch Verdünnung	86
4.3.2 Untersuchungen zur Aggregatbildung bei der Renaturierung von PDGF-A/B durch Verdünnung	88
4.4 Analyse des Renaturierungsvorgangs während der Gelfiltration	90
4.4.1 Beladung der Säule	92
4.4.2 Initiierung der Renaturierung	93
4.4.3 Faltung von PDGF während der Chromatographie	93
4.4 Potential der Gelfiltration zur Renaturierung von Proteinen	95
4.5 Modell für die Renaturierung von PDGF	98
4.6 Charakterisierung von PDGF	99
4.6.1 N-Terminus	99
4.6.2 Zweidimensionale SDS-PAGE	99
4.6.3 Fluoreszenzspektren	100
4.6.4 Chromatographisches Verhalten von PDGF	101
4.6.5 Biologischer Aktivitätstest	102
4.6.6 MALDI-Massenspektrometrie	104
4.6.7 Untersuchung auf Endotoxine	105
5. Zusammenfassung	107
6. Literatur	110
7. Anhang	130
7.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole	130
7.1.1 Abkürzungen	130
7.1.2 Symbole	132
7.2 Tabellen	134

1. Einleitung

Die Biotechnologie als Schlüsseltechnologie zur Produktion eines vielfältigen Spektrums herkömmlicher und neuartiger Substanzen -genannt seien vor allem pharmakologisch wirksame Proteine- ist wie kaum eine andere Technologie auf das Zusammenspiel der unterschiedlichsten Wissenschaftszweige angewiesen. Die molekularbiologischen Methoden zur heterologen Genexpression in Mikroorganismen oder Zellkulturen, die Kultivierung geeigneter Zellen und die darauffolgende Aufarbeitung und Reinigung des Produktes müssen gezielt aufeinander abgestimmt werden. Die Auswahl der einzelnen Prozeßkomponenten und deren Anpassung an die jeweiligen Eigenschaften des Proteins bedürfen vor allem im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit einer kritischen Prüfung. Dieser integrierte Ansatz zur Prozeßentwicklung wird zunehmend auch durch Simulationen zur Ökonomie unterstützt (Ernst et al., 1997).

Sawers und Jarsch (1996) unterteilen wirtschaftlich interessante rekombinant (gentechnisch) hergestellte Proteine in drei Kategorien (Tab. 1.1), deren Ordnungskriterium die Anforderungen bezüglich Qualität und Quantität des Produktes darstellen.

Tab. 1.1: Kategorien rekombinanter Proteine (nach Sawers und Jarsch, 1996)

Kategorie	Qualitäts- und Quantitäts-Anforderungen	Anwendung
1	Hohe Ausbeuten Geringe Kosten Reinheit ist nicht vorrangiges Ziel	Technische Enzyme (z.B. Proteasen und Lipasen für die Waschmittelindustrie); Proteine für die Lebensmitteltechnologie (z.B. Glucoseoxidase)
2	Hohe Reinheit Geringer Entwicklungsaufwand Geringe Kosten Ausbeute ist nicht vorrangiges Ziel	Proteine für die <i>in vivo</i> Diagnostik (z.B. Cholesterinoxidase, Glucosedehydrogenase, Penicillin G-Acylase)
3	Sehr hohe Qualität Validierte Produktion Gesamtprozeß muß FDA *-Richtlinien entsprechen	Humantherapeutika (z.B. Insulin, Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Wachstumsfaktoren)

* FDA: Food and Drug Administration, oberste Gesundheitsbehörde der USA

Technische Enzyme für die Waschmittel- oder Lebensmittelindustrie werden in großen Mengen zu geringen Kosten benötigt, wobei die Reinheit kein vorrangiges Ziel darstellt. Andererseits ist leicht einzusehen, daß die Qualitätsanforderungen an ein Protein für den Einsatz als Humantherapeutikum (z.B. Insulin) oberste Priorität haben. Allen drei Kategorien werden große ökonomische Wachstumsraten prognostiziert. Durch die rekombinante Herstellung werden zum einen bereits bestehende Arbeitsabläufe bzw. Produkte optimiert und zum anderen völlig neue Perspektiven z.B. in der Medizin eröffnet.

Besonderes Interesse kommt dabei den Wachstumsfaktoren zu. Diese Proteine stellen die Initiatoren einer zellinternen biochemischen Reaktionskaskade dar, die schließlich zur Zellteilung führt. Die mitogene Eigenschaft eines Wachstumsfaktors ist meistens sehr spezifisch auf einen Zelltyp begrenzt. Daher können diese Proteine sehr gezielt als Therapeutikum zur Wundheilung eingesetzt werden, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen hervorzurufen. Viele von Ihnen befinden sich bereits in der klinischen Erprobung der Phase III (Genetic Engineering News **30**, 1996). In dieser Phase stehen Untersuchungen zur Sicherheit und Wirksamkeit sowie zum Nachweis von potentiellen Nebenwirkungen an 500 - 3000 Patienten im Vordergrund. Der erfolgreiche Abschluß dieser Phase mündet in der Zulassung als Medikament. Das zu erwartende Marktvolumen für rekombinante Wachstumsfaktoren nach deren Zulassung läßt sich grob am Umsatz bereits erfolgreicher rekombinanter Pharmaproteine (z.B. Human-Insulin; Fa. Novo Nordisk; 1,6 Milliarden US\$; 1995) abschätzen.

Die Auswahl eines geeigneten Wirts zur industriellen Herstellung rekombinanter Proteine erfordert neben einem möglichst umfassenden Wissen über dessen Eigenschaften ein leistungsfähiges Induktionssystem sowie eine effektive Kultivierungsstrategie. Für das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* sind diese drei Punkte weitgehend erfüllt. Daher kommt es nach wie vor besonders häufig zum Einsatz. Mit einem kohlenstofflimitierten, exponentiell geführten Zufütterungsverfahren zur Kultivierung dieses Mikroorganismus steht eine Technik zur Verfügung, die Zelldichten von über $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Biotrockenmasse erlaubt (Korz et al., 1995).

Ein häufig auftretendes Phänomen bei der Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* ist die Bildung unlöslicher Proteinaggregate, die als sogenannte Einschluskörper oder Inclusion bodies in der Zelle eingelagert werden und keine biologische Aktivität besitzen (Marston, 1986; Kane und Hartley, 1988). Die direkte cytoplasmatische Expression liefert dabei relativ zu den anderen Methoden die höchsten Ausbeuten an heterologem Protein (bis zu 25 % des gesamten Zellproteins, Kane und Hartley, 1988). Eine Alternative stellt die Expression als Fusionsprotein dar. Dabei wird z.B. eine wirtseigene Signalpeptidsequenz dem Zielprotein vorgeschaltet, die den Transport in das Periplasma bewirkt und so proteolytischen Abbau und Einschlusskörperbildung verhindert (Marston, 1986; Wülfing und Plückthun, 1994).

Die Einschlusskörper werden hauptsächlich durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert und können in *E. coli* einen Durchmesser von 1 µm erreichen (Taylor et al., 1986). Das Zielprotein ist darin zu etwa 50% enthalten und durch DNA, ribosomale RNA, Phospholipide, Lipopolysaccharide und andere Proteine wie z.B. RNA-Polymerase verunreinigt (Rudolph, 1990; Maachupalli-Reddy et al., 1997). Als Ursache für diese Verunreinigungen wird zusätzlich auch die Kopräzipitation bei der Aufarbeitung durch Zentrifugation diskutiert (Rinas, 1998). Das Ausmaß der Einschlusskörperbildung ist vom jeweiligen Protein abhängig und lässt sich durch die Kultivierungstemperatur entscheidend beeinflussen (Schein und Noteborn, 1988; Schein, 1989).

Als Ursachen der Einschlusskörperbildung werden die Überlastung des zelleigenen Proteinsynthesystems durch die Überexpression, die hohen Konzentrationen an Zielprotein, kinetische Aspekte der Proteinfaltung als auch die Natur des heterologen Proteins diskutiert (z.B. Mukhopadhyay, 1997).

Für die Aufarbeitung dieser Proteine ist somit ein Verfahrensschritt einzuplanen, der zu biologisch aktivem Material führt (Renaturierung). Für die meisten Proteine ist dieser Schritt erfolgreich durchgeführt worden (Rudolph, 1996). Jedoch kann die Ausbeute an biologisch aktiver Spezies dabei unter 1 % liegen. Sie lässt sich allerdings häufig durch bestimmte Maßnahmen stark erhöhen. Mechanismen und Methoden der Renaturierung werden in Abschnitt 2 eingehender behandelt.

Als unbestreitbare Vorteile der Einschlußkörperbildung sind die relativ hohe Reinheit des Zielproteins und der weitgehende Schutz vor Proteolyse zu nennen (Marston, 1986; De Bernadez-Clark und Georgiou, 1991; Enfors, 1992; McCarthy und Schneppe, 1993; Rudolph, 1996). Wenn die Renaturierung effektiv gestaltet werden kann, können die Kosten des Gesamtprozesses einschließlich der zusätzlichen Verfahrensschritte gegenüber der Aufarbeitung löslichen Proteins deutlich geringer ausfallen. Ernst et al. (1997) konnten dies am Beispiel der Produktion von Heparinase I in *E. coli* zeigen.

Die Sicherstellung der Qualität bei der biotechnologischen Produktion gegenüber der traditionellen Pharmazeutika-Gewinnung aus z.B. Blut und Gewebe stellt durch die rekombinante Herstellung hohe Anforderungen an die prozeßbegleitende Analytik (Garnick et al., 1988). Die Verwendung von Mikroorganismen oder Zellkulturen erzeugt zwangsläufig auch neue Verunreinigungsquellen, deren Aufspüren und Beseitigung aufgrund pathogener Eigenschaften wichtig ist. Anicetti et al. (1989) teilen diese in definierte (z.B. Medienbestandteile) und undefinierte (z.B. Viren, wirtseigene DNA oder Proteine, Pyrogene) Kontaminationen ein. Weiterhin muß das Produkt auf Heterogenitäten untersucht werden. Besonders Aminosäuresubstitutionen aufgrund der heterologen Expression *per se* sind bislang unverhältnismäßig wenig betrachtet worden (Kurland und Gallant, 1996). Auch sind Deamidierungs-, Oxidations- und Proteolyseprodukte keine Seltenheit (Garnick et al., 1988; Anicetti et al., 1989).

Als Beispiel für den erheblichen analytischen Aufwand zur Qualitätskontrolle sei der Produktionsprozeß für hGH (human growth hormone) genannt. Dabei werden ca. 750 separate Tests durchgeführt. Zum Einsatz kommt die gesamte Bandbreite physikalischer, chemischer, immunologischer und biologischer Analytik (Anicetti et al., 1989; Geisow, 1991).

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Renaturierung des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (platelet-derived growth factor, PDGF) aus Einschlußkörpern rekombinanter *Escherichia coli*. PDGF ist ein Wachstumsfaktor mit guten Marktchancen für verschiedene therapeutische Bereiche (Meyer-Ingold, 1993).

Einen Schwerpunkt der Untersuchungen bildete die Entwicklung eines Verfahrens zur Renaturierung. Hohe Proteinkonzentrationen sollten bei weitgehender Minimierung von Nebenreaktionen zum Einsatz kommen. Der Einfluß verschiedener Umgebungsparameter auf den Renaturierungsprozeß wurde begleitend untersucht.

Parallel dazu galt der mechanistischen Betrachtung der Renaturierung besonderes Interesse. Durch Variation unterschiedlicher Reaktionsparameter sollten kinetische Daten zur Faltung des Proteins gewonnen werden. In diesem Zusammenhang wurden die drei möglichen Isoformen von PDGF (AA, AB, BB) vergleichend analysiert.

Bestehende Modelle zur Renaturierung aus der Literatur wurden auf ihre Anwendbarkeit der ermittelten Daten für PDGF hin geprüft und -wo erforderlich- erweitert.

Schließlich bildete die Charakterisierung von PDGF die Grundlage für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der eingesetzten Methoden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 PDGF (platelet-derived growth factor)

2.1.1 Allgemeines

Der Wachstumsfaktor aus Blutplättchen (PDGF) ist ein hochaktives Mitogen für Zellen mesenchymalen Ursprungs (Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen, Blutzellen etc.). Er spielt eine essentielle Rolle im Wundheilungsgeschehen und der Differenzierung embryonaler Zellen, aber auch bei verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. Arteriosklerose und Krebs (Ross et al. 1974; Ross et al., 1986; Hannink und Donoghue, 1989; Habenicht et al., 1990; Heldin, 1992; Meyer-Ingold und Eichner, 1995). Verschiedene erfolgreiche klinische Untersuchungen der Phasen II und III zeigen das therapeutische Potential von PDGF in der Behandlung chronischer nicht heilender Wunden (Robson et al., 1992; Meyer-Ingold, 1993; Szabo et al., 1995).

2.1.2 Das Molekül

PDGF ist ein dimeres Protein mit einer molaren Masse von etwa 25 kDa. Der isoelektrische Punkt wird mit 9,2 - 10,5 angegeben (Antoniades und Pantazis, 1989; Soma, 1992). Inkubation bei 100°C, bei 6 mol·l⁻¹ Guanidinium-Hydrochlorid für 10 min oder in einem pH-Bereich von 2 - 12 verändern die biologische Aktivität nicht (Raines und Ross, 1985). Die beiden Untereinheiten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Es wurden zwei verschiedene Monomere gefunden, die als A-Kette (110/125 Aminosäuren) bzw. als B-Kette (109 Aminosäuren) bezeichnet wurden. Das Auftreten zweier Formen der A-Kette wurde durch alternatives Splicing erklärt (Wise et al., 1989). Beide Ketten sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen Homologiegrad von etwa 60 % (Betsholtz et al., 1986).

Beide Gene werden als Vorläufermoleküle exprimiert, die nachfolgend proteolytisch prozessiert werden (Betsholtz, 1986; Hannink und Donoghue, 1989). Diese so entstandenen maturen PDGF-Ketten sind nicht glykosiliert (Jaumann et al. 1991). Alle drei möglichen Isoformen AA, AB und BB existieren *in vivo*, wobei der AB-Isoform der größte Anteil zukommt (Östmann et al., 1991). Bei Annahme einer direkten Korrelation zwischen vorhandener Menge und Bedeutung *in vivo*, spielt diese Form offensichtlich eine herausragende Rolle (McCarthy und Schneppe, 1993).

Weiterhin sind zwei Rezeptortypen bekannt, die als α - und β -Rezeptor bezeichnet werden (Heldin und Westermark, 1989). Die Bindung der jeweiligen PDGF-Isoformen an die Rezeptortypen ist unterschiedlich ausgeprägt, so daß verschiedene mitogene Aktivitäten resultieren (Hoppe et al., 1990; Claesson-Welsh, 1994). Inui et al. (1994) dokumentierten für PDGF-BB und PDGF-AB hohe mitogene Aktivitäten, wohingegen PDGF-AA lediglich die Proteinsynthese, nicht jedoch die DNA-Synthese stimuliert.

Die Kristallstruktur des Homodimeren PDGF-BB wurde von Oefner et al. (1992) aufgeklärt (Abb. 2.1, Seite 8) und zeigt einen hohen Anteil antiparalleler β -Faltblattstrukturen sowie drei charakteristische Loopregionen, die bei antiparalleler Anordnung der beiden Monomere an beiden Enden des Moleküls eine Art Cluster bilden, denen essentielle Funktionen bei der Bindung an den Rezeptor zukommen (Oefner et al., 1992; Andersson 1995). Das Molekül ist mit 6 x 2 x 1,5 nm pro Monomer sehr flach und nimmt als Dimer eine schalenförmige, fast zweidimensionale Gestalt ein (Isaacs, 1995).

Jedes Monomer enthält zudem eine knotenartige Ansammlung von sechs disulfidverbrückten Cysteinresten. Dieses spezifische Strukturelement wurde inzwischen bei vielen Proteinen mit mitogenen Eigenschaften gefunden. Sie werden deshalb neuerdings auch in der Gruppe der Cysteinknotenproteine zusammengefaßt (Sun und Davies, 1995; Isaacs, 1995). Auffallend dabei ist die Tendenz zur Dimerbildung (McDonald und Hendrickson, 1993). Die große Anzahl der intra- und intermolekularen Disulfidverbrückungen verleiht dem Molekül eine außerordentliche Stabilität (s.o.) Allerdings sind die intramolekularen Disulfidbrücken für die biologische Aktivität essentiell (Pötgens, 1994), während die intermolekularen lediglich zur Stabilität beitragen (Kenney, 1994; Prestrelski et al., 1994).

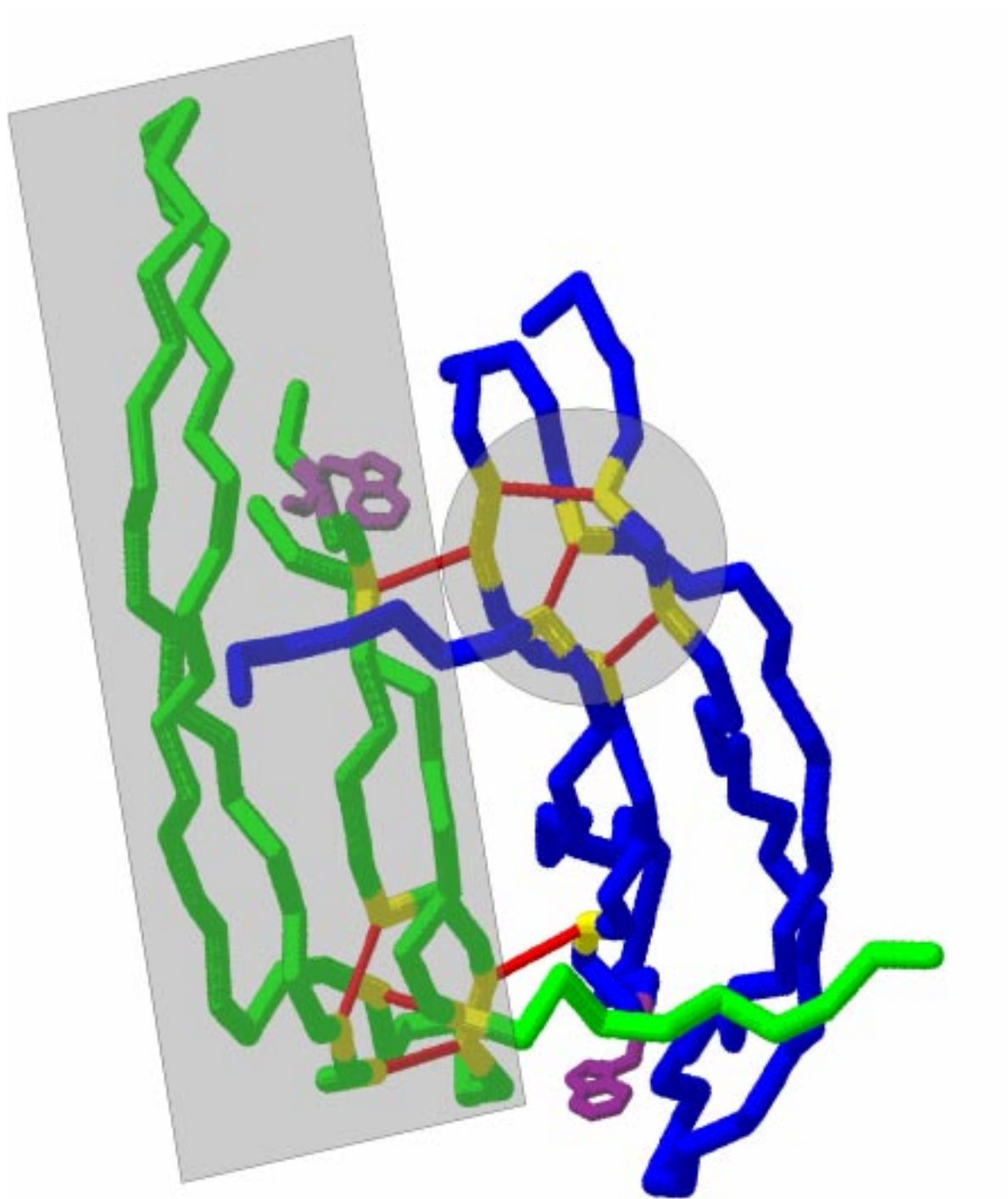


Abb. 2.1: Kristallstruktur von PDGF-BB. Veranschaulichung der wichtigsten Strukturmerkmale: **grün, blau** - PDGF-B-Monomere; **gelb** - Cysteinreste; **rot** - Disulfidbrücken; **violett** - Tryptophanrest; **grau, Rechteck** - β -Faltblattstrukturen; **grau, Kreis** - Cysteinknoten.

2.1.3 Gewinnung von PDGF

Die Gewinnung und Aufreinigung von PDGF aus natürlichen Quellen (Blutplasma, Serum) ist sehr aufwendig (Raines et al., 1985; Antoniadou und Pantazis, 1989) und mit geringen Ausbeuten behaftet. Zudem erhält man ein Gemisch aus allen drei Isoformen. Eine optimierte Routinepräparation liefert 500 µg aus 1000 l Blut (Heldin, 1987 und 1992). Aufgrund dieser geringen Mengen sowie der Gefahr von Kontaminationen (z.B. AIDS) wurde schon frühzeitig eine rekombinante Produktion angestrebt.

Die erste erfolgreiche Expression biologisch aktiver PDGF-BB - Homodimere gelang Kelly et al. (1985). Eine erste *in vitro* - Renaturierung von PDGF-BB aus Einschlusskörpern von *E. coli* wurde von Hoppe et al. (1989) beschrieben. Mittlerweile wurden ähnliche Ergebnisse auch für die beiden anderen PDGF-Varianten veröffentlicht. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Ansätze zeigt Tab. 2.1 (Seite 10).

Ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Strategien hinsichtlich der Ausbeute ist aufgrund der unvollständigen Datenlage nicht möglich. Jedoch sind die Unterschiede bezüglich der Aufarbeitung zwischen bakteriell und mittels eukaryontischer Zellen produziertem bzw. aus Blutkonserven isoliertem PDGF deutlich zu erkennen. Während die beiden letztgenannten Strategien biologisch aktives Protein liefern, wird bei bakterieller Produktion nicht aktives Protein in Form von Einschlusskörpern gebildet, das nachfolgend renaturiert werden muß. Dazu sind zusätzliche Verfahrensschritte notwendig.

Das Produktionsverfahren von Schneppe et al. (1993) unterscheidet sich von den anderen durch eine direkte cytoplasmatische bicistronische Expression der maturen PDGF-A und PDGF-B - Ketten. Durch Wahl unterschiedlicher Translations-Initiations-Regionen vor dem jeweiligen Strukturgen ist das Syntheseverhältnis der beiden Ketten zueinander variierbar. Diese als "genetische Titration" bezeichnete Einstellung der Stöchiometrie beider Untereinheiten bietet somit prinzipiell bereits auf genetischer Ebene die Möglichkeit, Ausbeuteverluste der einen Untereinheit bei nachfolgenden Aufreinigungsschritten auszugleichen (Schneppe et al., 1993).

Tab. 2.1: Gewinnung von biologisch aktivem PDGF

Quelle	Stamm, Produktions- bedingungen	PDGF- Isoform	Auf- arbeitungs- schritte	Ausbeute	Literatur
Blutkonserven		Gemisch	12	500 µg aus 1000 l	Heldin 1987
<i>E. coli</i>	K12-NF1 cro-β-gal- PDGF- A bzw. B Fusionsgen 1 l-Kultur LB-Medium 42°C, 3h	AA	13	0,2 mg·l ⁻¹ Kultur	Hoppe et al. 1990
		AB	13	0,4 mg·l ⁻¹ Kultur	Hoppe et al. 1990
		BB	13	0,7 mg·l ⁻¹ Kultur	Hoppe et al. 1989
	K12-CAG629 Vektor: pTacBI ^q 20 l-Kultur Lym-1-Medium 37°C, IPTG- Induktion, 2h	BB	12	0,8 mg·l ⁻¹ Kultur	Alexander et al. 1992
	K12-TG2 bicistron. Vektor: pBS/PDGF-BA2 10 l-Kultur LB-Medium 42°C, 3h	AB	11	150 mg aus 25 g Biofeuchtmasse Gesamt: keine Angabe	Schneppe et al. 1993
	K12-FM5 Vektor: pCFM1156 42°C, mehrere h	A _L A _L L=125 Aminos.	12	60 - 80 mg·g ⁻¹ BTM Gesamt: 0,15 - 0,3 g·l ⁻¹ Kultur	Lyons und Thomason 1991
		BB	12	60 - 80 mg·g ⁻¹ BTM Gesamt: 0,25 - 0,5 g·l ⁻¹ Kultur	
<i>S. cerevisiae</i>	Vektor pMPOT	BB	k. A.	k. A.	Kelly 1985
BHK	BHK 21 Vektor pODa 2,3 l Bioreaktor DMEM+Ham's F12 - Medium	AA	6	Sekretion : 300 ng/24h/10 ⁶ Zellen Gesamt: 0,2 mg l ⁻¹ Kulturüberstand	Eichner et al. 1989
CHO	CHO 106:3 Vektor: pSV7d- PDGF-A102-B1 DMEM-Medium	AB	8	Sekretion: 700 ng/24h/10 ⁶ Zellen Gesamt: 4%	Östmann et al. 1988

2.2 Proteinfaltung

2.2.1 Grundlagen

Damit ein Protein biologisch aktiv ist, muß es eine spezifische dreidimensionale Struktur einnehmen. Die genetische Information liefert jedoch nur eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren, die Primärstruktur. Die meisten Proteine können aber *in vitro* spontan ihre biologisch aktive Konformation erreichen, was darauf hindeutet, daß die Tertiärstruktur durch die Primärstruktur vorgegeben ist. Die Aminosäureseitenketten wechselwirken dabei in feinabgestimmter Weise miteinander durch ionische und hydrophobe Kräfte sowie über Wasserstoffbrückenbindungen und sorgen damit für eine stabile Struktur. Der Hauptanteil wird dabei den hydrophoben Wechselwirkungen sowie dem durch Freisetzung von anhaftenden Wassermolekülen der nicht-polaren und polaren Aminosäuren erreichten Entropiegewinn zugeschrieben (Seckler und Jaenicke, 1992).

Der weitverbreiteten These, der native bzw. biologisch aktive Zustand eines Proteins sei prinzipiell auch der thermodynamisch stabilste Zustand (globales Energieminimum), tritt zunehmend auch die These der kinetischen Kontrolle (lokales Energieminimum) entgegen (Baker und Agard, 1994).

Geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Proteinfaltung wie z.B. Prolinisomierung oder Disulfidbrückenbildung werden *in vivo* von speziellen Enzymen katalysiert. Eine andere Gruppe von Proteinen (Chaperone) verhindert Aggregationsreaktionen. Im folgenden wird aus Gründen der Komplexität der Thematik die *in vivo* - Proteinfaltung nicht näher betrachtet und ausschließlich auf die *in vitro* - Faltung eingegangen.

Die Änderung der Umgebungsparameter (z.B. Temperatur, pH-Wert, Redoxbedingungen, Salzkonzentration, Lösungsmiteleigenschaften) führt zwangsläufig zu Änderungen im Kräftegleichgewicht und damit der Konformation des Moleküls bis hin zum vollständigen Verlust der biologischen Aktivität sowie der Sekundärstrukturelemente (Denaturierung). Für eine detailliertere Betrachtung wird auf Creighton (1990); Jaenicke (1991); Pain (1994) und Rudolph und Lilie (1996) verwiesen.

Mit der Entwicklung rekombinanter Produkte und der damit häufig verbundenen Einschlußkörperbildung (Abschnitt 1) gewinnt die Proteinfaltung zunehmend auch praktisches Interesse (Thatcher und Hitchcock, 1994).

2.2.2 Bildung von Disulfidbrücken

Disulfidbrücken zwischen den Schwefelatomen zweier Cysteinreste stellen eine echte chemische Bindung dar und verleihen dem Proteinmolekül eine höhere Stabilität. Die Bildung geschieht über das Thiolatanion, das in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit dem korrespondierenden Thiol steht. Die Reaktion erfolgt als nucleophiler Angriff eines Thiolatanions an einen Elektronenakzeptor (z.B. molekularer Sauerstoff in Gegenwart von Spuren eines Schwermetalls oder eine Disulfidverbindung) nach einem S_N2 - Mechanismus (Gilbert, 1990; Gilbert, 1994; Darby und Creighton, 1995). Abb. 2.2 veranschaulicht diese Reaktion. Dabei müssen die C-Atome der Cysteine für eine erfolgreiche Reaktion in einem Abstand von 0,4 - 0,9 nm vorliegen (Creighton, 1989).

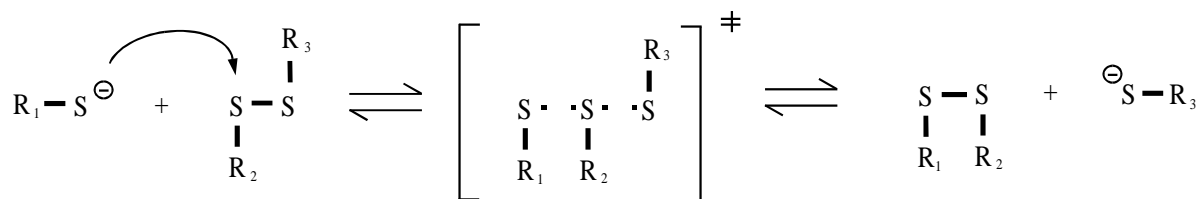


Abb. 2.2: Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Disulfidbrückenbildung ($\text{R}_{1,2,3}$ - Molekülreste; S - Schwefelatom)

Der pK_a -Wert einer typischen Cystein-Thiolgruppe liegt bei etwa 8,6, jedoch ist dieser Wert stark von der umgebenden Ladungsverteilung abhängig. Positiv geladene Gruppen z.B. ziehen Elektronendichte ab und erniedrigen den pK_a -Wert des Thiols, was einer Gleichgewichtsverschiebung auf die Seite des Thiolatanions gleichkommt. Negative geladene Gruppen bewirken das Gegenteil. Untersuchungen zum Thiol-Disulfidaustausch wurden hauptsächlich an kleinen synthetischen Peptiden durchgeführt, so daß eine Beurteilung für ganze Proteine sehr schwierig ist (Gilbert,

1990; Gilbert, 1994). Auch sterische Effekte beeinflussen die Bildung von Disulfidbrücken, da der nucleophile Angriff eines Thiolatanions auf einen Elektronenakzeptor bei bereits ausgeprägter dreidimensionaler Struktur oftmals nicht mehr stattfinden kann (Tannhauser et al., 1997).

Die Beteiligung von Disulfidbrücken bei der Faltung von Proteinen macht diesen Prozeß sehr komplex. Mit zunehmender Anzahl von Cysteinresten in einem Protein wird die Anzahl statistisch möglicher Disulfidbrücken sehr hoch (Jaenicke und Rudolph, 1989). Die 16 Cysteinreste im Falle des dimeren PDGF könnten demnach über $2 \cdot 10^6$ verschiedene Disulfidbrücken ausbilden. Trotzdem werden im allgemeinen korrekte Disulfidverbrückungen bei der Renaturierung in endlicher Zeit gefunden. Creighton et al. (1974, 1992) zeigten allerdings am Beispiel des monomeren Trypsininhibitors aus Rinderpankreas (BPTI), daß während der Faltung auch nicht-native Disulfidbrücken ausgebildet werden. Chatrenet und Chang (1993) berichteten Ähnliches über die Faltung von Hirudin.

Für eine erfolgreiche *in-vitro* Renaturierung mit Disulfidbildung werden meistens niedermolekulare Thiolverbindungen und ihre Disulfidvarianten eingesetzt, da Oxidation mit molekularem Sauerstoff häufig auch zur Oxidation anderer Aminosäuren führt. Zusätzlich ist diese Reaktion sehr langsam (Thatcher und Hitchcock, 1994). Die gebräuchlichste Verbindung ist Glutathion in seiner reduzierten (GSH) und oxidierten (GSSG) Form. Dabei wird die reduzierte Form häufig in einem 10-50-fachen Überschuß eingesetzt (Rudolph und Fuchs, 1983). Dieses Redoxsystem erlaubt damit sowohl die Bildung als auch die Lösung von Disulfidverbrückungen. Die Halbwertszeit für die Reaktion in Anwesenheit von $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG mit einer exponierten Thiolgruppe bei pH 8,7 wird mit ca. 30 s angegeben (Gilbert, 1994).

2.2.3 Assoziation

Mit Erreichen einer bestimmten molaren Masse tendieren Proteine dazu, als oligomere Strukturen aus verschiedenen oder gleichen Untereinheiten vorzuliegen. Monomere Strukturen über 50 kDa sind eher selten (Price, 1994). Diese modulare

Bauweise großer Proteine vereinfacht die Faltung und beschleunigt den Gesamtprozeß *in vivo* (Seckler und Jaenicke, 1992). Der Weg zur nativen Spezies erfordert neben der Faltung der Untereinheiten demgemäß auch deren korrekte Assoziation. Die hierbei wirkenden Kräfte sind dieselben wie bei der Faltung (Entropiegewinn durch Wasserausschluß der hydrophoben Bereiche; Jaenicke und Rudolph, 1986).

Die Untereinheiten bilden dabei zueinander komplementäre spezifische geometrische Oberflächen aus (Jaenicke und Rudolph, 1986; Price, 1994). Die Kinetik des Faltungsprozesses setzt sich somit aus unimolekularen Teilschritten (Reaktionsordnung 1) zur Generierung der spezifischen Oberfläche und mindestens einem bimolekularen Schritt der Assoziation (Reaktionsordnung 2) zusammen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Prozesses kann von Protein zu Protein verschieden sein. Die Assoziation geschieht dabei allerdings häufig sehr schnell (10^4 - 10^6 l·mol⁻¹·s⁻¹; pH ~7, 20-25°C; Price, 1994). Auch eine unimolekulare Isomerisierung oder Konformationsänderung auf der Oligomerebene kann geschwindigkeitsbestimmend sein (Jaenicke, 1991; Seckler und Jaenicke, 1992; Price, 1994).

Jaenicke und Rudolph (1986) beschreiben die separate Faltung der Untereinheiten als notwendige Voraussetzung für die Assoziation. Untersuchungen zur Renaturierung der bakteriellen heterodimeren Luciferase zeigen hingegen, daß die Untereinheiten sich gegenseitig in ihrer Faltung beeinflussen und nur so zur biologisch aktiven Konformation gelangen (Clark et al., 1993; Sinclair et al., 1993). Milla und Sauer (1994) ordnen diese Beobachtungen zwei Klassen oligomerer Proteine zu:

Klasse 1: Die Assoziation findet nach separater Faltung der Monomere statt.

Klasse 2: Faltung und Assoziation sind eher konzertierte Prozesse.

Mitglieder der Klasse 2 besitzen in ihrer nativen Struktur ineinander verknäuelte Monomere, wobei die Unterscheidung zwischen tertiärer und quartärer Struktur nicht eindeutig möglich ist. Beispiele hierzu sind bei Milla und Sauer (1994) beschrieben. Während die *in vitro* - Faltung kleiner Proteine im Bereich von Sekunden abgeschlossen sein kann, kann dies bei großen Proteinen mitunter Stunden oder sogar Tage dauern (Buchner und Rudolph, 1991; Jaenicke, 1991).

2.2.4 Nebenreaktionen

Parallel zum Faltungsweg eines Proteins treten häufig Nebenreaktionen auf, die die Ausbeute an nativer Spezies verringern bzw. die Reaktionszeiten verlängern. Dies gilt vor allem für komplex aufgebaute Proteine (Price, 1994). Diesen Reaktionen gemein ist das frühe Auftreten im Faltungsgeschehen, wo die Sekundärstrukturelemente zwar schon native Qualität besitzen, zu deren gegenseitiger dreidimensionaler Anordnung jedoch noch viele Möglichkeiten bestehen. Ist ein bestimmtes Maß an dreidimensionaler Struktur erreicht, so wird der Einfluß von Nebenreaktionen als marginal betrachtet und der Weg zur nativen Struktur als Einbahnstraße angesehen.

Es handelt sich dabei zum einen um reversible Reaktionen, bei denen nichtnative Konformationen gebildet werden, z.B. der "molten globule"-Zustand (s.u.), transiente Assoziate, unkorrekte Disulfide, Prolinisomerisierung (Ptitsyn, 1992; Creighton, 1992; Cleland und Wang, 1992; Christensen und Pain, 1994; Nall, 1994; Pecorari et al., 1996; Creighton et al., 1996).

Der "molten globule"-Zustand wird von verschiedenen Autoren als ein sehr frühes Intermediat der Proteinfaltung bezeichnet, dem spezifische Eigenschaften zugeordnet werden (Seckler und Jaenicke, 1992; Ptitsyn, 1992; Christensen und Pain, 1994). Demnach besitzt dieser Zustand

- einen 10 - 15 % größeren hydrodynamischen Radius als im nativen Zustand
- ein hohes Maß nativer Sekundärstrukturelemente (70 - 90 %)
- wenig ausgebildete tertiäre Kontakte
- exponierte hydrophobe Gruppen und dadurch eine ausgeprägte Neigung zur Aggregation
- keine biologische Aktivität.

Die zweite Gruppe von Nebenreaktionen beinhaltet die irreversible Bildung von Aggregaten. Dabei kommt es zu unspezifischen Anlagerungen un- bzw. teilgefalteter Moleküle untereinander mit Reaktionsordnungen ≥ 2 (De Bernardez-Clark und Georgiou, 1991; Kiefhaber et al., 1991; Jaenicke, 1995). Maßgeblich wirksame Kräfte dieser Assoziation sind wiederum hydrophobe Interaktionen.

Aufgrund des mindestens bimolekularen Charakters der Reaktion ist das Ausmaß der Aggregation stark konzentrationsabhängig (Jaenicke, 1995; Rudolph und Lilie, 1996). Auch andere Umgebungsparameter beeinflussen das Verhältnis von Faltung zu Aggregation (Kiefhaber et al., 1991, Buchner und Rudolph, 1991).

Die elektronenmikroskopische Strukturaufklärung beschreibt die Aggregate als irreguläre Netzwerke mit einer breiten Partikelgrößenverteilung. Allerdings wurden teilweise hochstrukturierte Bereiche der 10-15fachen Größe des nativen Proteins entdeckt, denen die gefundenen nativen spektroskopischen Eigenschaften zugesprochen wurden (Zettlmeissl et al., 1979; Jaenicke, 1995).

Jeder Renaturierungsschritt im Rahmen der rekombinanten Proteinproduktion wird somit unter praxisrelevanten Bedingungen auf die weitgehende Vermeidung der Aggregationsreaktionen abzielen (Abschnitt 2.3).

2.2.5 Mechanismen, Modelle

2.2.5.1 Grundmodell

Die vorangegangenen Ausführungen beschreiben die Faltung von Proteinen als einen vielstufigen komplexen Prozeß, an dem produktive und unproduktive Reaktionen beteiligt sind. Für viele Proteine wurden die experimentellen Befunde zu wahrscheinlichen Reaktionsabfolgen zusammengefaßt. Als Grundmodell für oligomere Proteine läßt sich dabei folgendes Reaktionsschema formulieren:



Schema 1: Grundmodell für die Renaturierung oligomerer Proteine

Ausgehend von vollständig denaturierten Monomeren (U) findet eine Faltung zu assoziationskompetenten Monomeren statt (M'). In einer bimolekularen Reaktion wird das Dimer D' gebildet. Eine Isomerisierung oder Umfaltung auf dieser Ebene führt

schließlich zum nativen Dimer (N). Grundsätzlich sind alle Teilschritte als reversibel zu betrachten, wobei jedoch ab einem bestimmten Ausmaß an Tertiärstruktur die Rückreaktion als vernachlässigbar angesehen werden kann. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt kann dabei prinzipiell jede Teilreaktion sein. Es wird auch in vielen Fällen eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Schrittes beobachtet. Bei hohen Konzentrationen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt häufig eine Reaktion erster Ordnung, während bei niedrigen Konzentrationen ein bimolekularer Schritt limitierend ist (Price, 1994).

Experimentelle Daten zur Renaturierung der dimeren porcinen Malat-Dehydrogenase aus Mitochondrien (mMDH) zeigen einen sigmoiden zeitlichen Verlauf und deuten auf Schema 1 hin (Jaenicke et al., 1979). Einen eindeutigen Rückschluß auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ließen die Daten nicht zu, jedoch konnten Sie durch einen irreversiblen konsekutiven uni-bimolekularen Mechanismus gut beschrieben werden.

Auch die Renaturierung der tetrameren porcinen Lactat-Dehydrogenase (pLDH) kann mit diesem Modell angepaßt werden. Aus strukturierten Monomeren entstehen schnell Dimere, die in einer weiteren bimolekularen Reaktion untereinander zu Tetrameren reagieren (Rudolph und Jaenicke, 1976; Zettlmeissl et al., 1982).

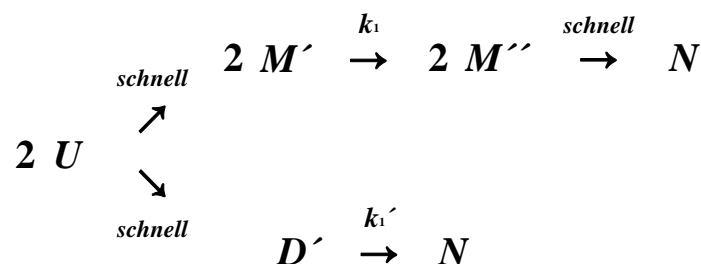
Burns et al. (1982a, 1982b) konnten am Beispiel der trimeren Aspartat-Transcarbamoylase zeigen, daß die Assoziation zum Dimer geschwindigkeitsbestimmend ist, wenn als Ausgangspunkt bereits gefaltete Monomere eingesetzt werden. Ausgehend vom vollständig denaturierten Zustand bestimmt jedoch die Faltung zum assoziationskompetenten Monomer die Kinetik. Die Weiterreaktion zum Trimer geschieht dabei in beiden Fällen sehr schnell.

Weitere Beispiele für einen uni-bimolekularen Mechanismus sind die Renaturierung der heterodimeren bakteriellen Luciferase (Clark et al., 1993; Sinclair et al., 1993; Ziegler et al., 1993) und das dimere P22 Arc Repressorprotein (Milla und Sauer, 1994).

2.2.5.2 Erweiterte Modelle

Das in 2.2.5.1 beschriebene Minimalschema ist durch Einfügen zusätzlicher Teilschritte aufgrund der experimentellen Befunde erweiterbar. Dutta et al. (1997) konnten bei der *in vitro* Faltung der dimeren UDP-Galaktose 4-Epimerase aus *E. coli* als geschwindigkeitsbestimmende Schritte das Erreichen der enzymatischen Aktivität identifizieren. Dabei wird auf der Stufe der sich schnell bildenden Dimere in einer Teilreaktion langsam eine NAD-Bindungsstelle generiert und in einer weiteren bimolekularen Reaktion NAD gebunden.

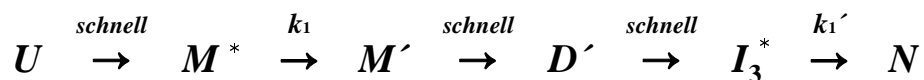
Bei Untersuchungen zur Renaturierung der dimeren porcinen cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (cMDH) wurden zwei verschiedene Reaktionswege zum biologisch aktiven Protein postuliert. Schema 2 veranschaulicht diesen Sachverhalt (nach Rudolph et al., 1986). Etwa 68 % der vollständig denaturierten Peptidketten (U) werden schnell in ein monomeres Intermediat M' überführt, das in einer geschwindig-



Schema 2: Renaturierung von cMDH (1,3 bis 13 mg·l⁻¹; 20°C)

keitsbestimmenden Reaktion erster Ordnung zu einem assoziationskompetenten Monomer (M') faltet, aus dem schnell ($>10^6 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 20°C) das native Dimer (N) entsteht. Parallel dazu assoziieren etwa 32 % der denaturierten Peptidketten schnell zu einem dimeren Intermediat (D'), aus dem heraus in einer geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion erster Ordnung das native Dimer (N) entsteht. Die Kinetik der Renaturierung wird somit durch Konformationsänderungen auf der Ebene strukturierter Monomere bzw. Dimere bestimmt.

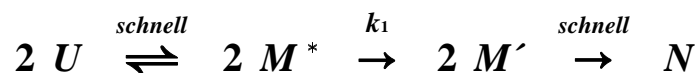
Hlodan und Pain (1995) beobachteten bei der Renaturierung des trimeren Tumor-Nekrosis-Faktors (TNF α) eine schnelle Bildung von Dimeren (D') und schließlich Trimeren (I_3^*), deren Eigenschaften denen eines "molten globule"-Zustandes entsprachen, von dem aus sich in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Bildung des nativen Moleküls vollzog (Schema 3 bzw. Hlodan und Pain, 1995).



Schema 3: Renaturierung von TNF α

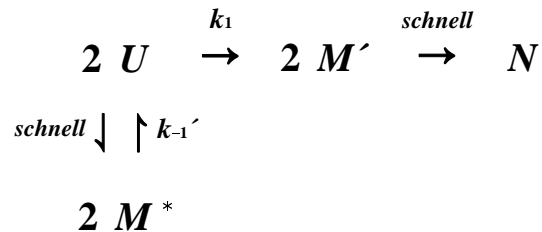
Die Beobachtung eines im Faltungsweg sehr späten Intermediates mit Eigenschaften, die denen eines "molten globule"-Zustandes entsprechen, ist sehr ungewöhnlich. Jedoch ließen die experimentellen Daten andere Schlußfolgerungen nicht zu.

Die Renaturierung des nicht-kovalent verbundenen homodimeren brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein Beispiel mit einem limitierenden Teilschritt erster Ordnung. Philo et al. (1993) identifizierten ein Intermediat mit Eigenschaften, wie Sie für den "molten globule"-Zustand typisch sind (M^*). Aus diesem Zustand entsteht in einem unimolekularen Schritt ein assoziationskompetentes Monomer (M'), das im folgenden schnell zum nativen Dimer (N) weiterreagiert (Schema 4a; Philo et al., 1993).



Schema 4a: Renaturierung von BDNF

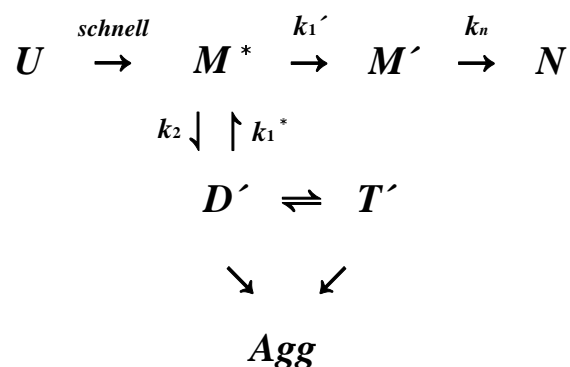
Ein zweiter Ansatz postuliert ein zum Faltungsweg kinetisch konkurrierendes Gleichgewicht zwischen den vollständig denaturierten Polypeptidketten und dem "molten globule"-Zustand (Schema 4b; Philo et al., 1993). Dieser wird schneller gebildet als die Rückreaktion stattfindet.



Schema 4b: Renaturierung von BDNF

Beide Modelle lieferten eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die eingesetzten Methoden erlaubten jedoch keine eindeutige Aussage zugunsten eines der beiden Modelle.

Bei zusätzlicher Betrachtung der Aggregation in bezug auf die Faltungsreaktion spielt der "molten globule"-Zustand eine wesentliche Rolle. In ihm sind zumindest einige hydrophobe Aminosäureseitenketten zum Lösungsmittel exponiert. Hydrophobe Wechselwirkungen sind aber hauptverantwortlich für Aggregationsreaktionen.



Schema 5: Renaturierung von bCAB ($> 10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Cleland und Wang (1990, 1991, 1992) beschrieben am Beispiel der monomeren bovinen Carboanhydrase B (bCAB) die Bildung transienter Assoziate (Dimere D' und Trimere T') aus dem "molten globule"-Zustand heraus, deren Dissoziation den

limitierenden Teilschritt der Renaturierung darstellt (Schema 5). Ferner wird die Dimerbildung als Keim für die weitere Anlagerung teilgefalteter Moleküle betrachtet, die schließlich irreversibel zu Makroaggregaten führt (Agg).

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Renaturierung des bovinen Wachstumshormons (bGH) gemacht (De Felippis et al., 1993).

Plomer und Gafni (1993) veröffentlichten Ergebnisse zur *in vitro* Faltung der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase, deren Kernaussage eine Renaturierungskinetik nach einem bi-unimolekularen Mechanismus (vgl. Schema 1) mit kinetisch konkurrierender Aggregation aus einem frühen Intermediat ist (vgl. Schema 5). Die schnell gebildeten Aggregate assoziierten über den Versuchszeitraum von 2h untereinander weiter, nahmen dabei jedoch keinen Einfluß mehr auf die Faltung der nicht aggregierten Spezies zum nativen Protein.

2.2.6 Bedeutung für PDGF

Eine Analyse des Renaturierungsvorgangs von PDGF aufgrund der in den vorangegangenen Abschnitten behandelten Aspekte beinhaltet somit zunächst die Faltung zum assoziationskompetenten Monomer inklusive der Generierung der drei intramolekularen Disulfidverbrückungen zu dem erwähnten Cysteinknoten. Für diese Reaktion müssen die vollständig denaturierten und reduzierten Polypeptidketten die notwendige Sekundärstruktur zur Verfügung stellen, die die richtigen Abstände der Cysteinreste zueinander gewährleistet. Die PDGF-Monomere bilden ausschließlich β -Faltblattstrukturen.

Die Geschwindigkeit der Bildung der β -Faltblattstrukturen ist stark abhängig von deren Stabilisierung. Sie kann sehr schnell (~ 25 ms; Varley et al., 1993) erfolgen oder auch extrem langsam ($10^3 - 10^5$ s; Finkelstein, 1991). Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird dabei die Bildung eines β -Faltblattkeimes angesehen, der dann nach der Art eines Reißverschlusses zur vollständigen β -Faltblattstruktur schnell weiterwächst ("hydrophobic zipper"-Modell; Dill et al., 1993; Gronenborn und Clore, 1994; Carlsson

et al., 1995). Eine Stabilisierung kann durch hydrophobe Wechselwirkungen (Varley et al., 1993) oder wie im Beispiel des tetrameren Platelet Factor-4 durch Disulfidbrücken erfolgen (Mayo et al., 1991). Für die PDGF-Monomere treffen vermutlich beide Stabilisierungsmöglichkeiten zu. Dabei müssen die Cysteinreste so lange in geeignetem Abstand zueinander gehalten werden, daß eine Disulfidbildung erfolgen kann (Halbwertszeit ~ 30 s, Abschnitt 2.2.2). Die Disulfidbrücken ihrerseits verleihen den β -Faltblattstrukturen eine hohe endgültige Stabilität (Abschnitt 2.1.2).

Als Folgeschritt kann dann die Assoziation zum Dimer erfolgen, das durch die zusätzliche Ausbildung zweier Disulfidbrücken weiter stabilisiert wird (Dimerisierung). Ein gravierender Nachteil bei der Untersuchung der Renaturierung von PDGF gegenüber anderen Proteinen ergibt sich dadurch, daß die biologische Aktivität nur sehr aufwendig in einem Mitogentest über die Kultivierung geeigneter Zellen nachzuweisen ist, der zudem nur begrenzt quantitative Aussagen liefert (Abschnitt 3.9.2).

Die beschriebenen Aspekte der Proteinfaltung bezüglich PDGF lassen den Vorgang der Renaturierung sehr komplex erscheinen. Nebenreaktionen (insbesondere Aggregation) sind ebenfalls zu erwarten. Eine praxisnahe Betrachtung erfordert die Einbeziehung von Möglichkeiten zur Minimierung bzw. Vermeidung der Aggregationsreaktionen. Im folgenden sollen deshalb einige Strategien zur *in vitro* Proteinfaltung vorgestellt werden.

2.3 Verfahren zur Renaturierung

Bei der Entwicklung eines Prozesses zur Renaturierung steht die weitgehende Vermeidung von Aggregationsreaktionen im Vordergrund. Die meisten Strategien zielen auf eine maximale räumliche Trennung der Proteinmoleküle, da die Aggregation konzentrationsabhängig ist (Reaktionsordnung ≥ 2).

Der Renaturierungsschritt selbst besteht in der Schaffung von Bedingungen, die eine Faltung zur biologisch aktiven Konformation ermöglichen und ist daher ein einfacher Pufferaustausch (Entfernen des denaturierenden Agens). Membranverfahren wie z.B. die cross-flow-Filtration sind im industriellen Maßstab Routineoperationen. Sie

erlauben hohe Durchsätze, leichtes Scale-up und sind preisgünstig. Zusätzlich findet eine Probenkonzentrierung statt. Ähnliches gilt für die counter-current-Dialyse. Die Gelfiltration dagegen ist den vorgenannten Verfahren bezüglich der genannten Parameter unterlegen, bietet jedoch den entscheidenden Vorteil der Minimierung von Aggregation (s.u.). Eine vergleichende Betrachtung dieser Verfahren zum Pufferaustausch ist bei Kurnik et al. (1995) beschrieben.

Im einfachsten Fall wird die Proteinkonzentration sehr gering gewählt ($< 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ein Nachteil dabei ist die Handhabung sehr großer Volumina. Die dafür notwendigen Tanks (1000 m^3) beanspruchen im Falle von tPA 75 % der Investitionskosten (Datar et al., 1993). Eine Weiterentwicklung der Verdünnungstechnik beschreibt die stufenweise Proteinzugabe zum Renaturierungspuffer. Ziel ist, die Konzentration an denaturiertem bzw. teilgefaltetem Protein zu verringern und damit das Ausmaß an Aggregation zu begrenzen (Fischer et al., 1992).

In vielen Fällen lieferte die Zugabe sogenannter "folding enhancers" einen drastischen Ausbeuteanstieg. Fischer et al. (1986) beschrieben bei der Renaturierung des Gewebe-Plasminogenaktivators (tPA) eine Ausbeuteerhöhung von fast 0% auf 50% mit Zusatz von $0,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L-Arginin. Dieser positive Effekt des L-Arginins ließ sich auch auf andere Proteine übertragen (Buchner und Rudolph, 1991; Lin und Traugh, 1993). Verschiedene Detergenzien wurden ebenfalls erfolgreich eingesetzt (Zardeneta und Horowitz, 1994; Wetlaufer et al., 1995). Nicht denaturierende Konzentrationen von Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff sowie die Ionenstärke haben einen ähnlichen Einfluß. Allen diesen Zusätzen ist gemein, daß sie durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel oder bestimmten Aminosäuren Faltungsintermediate gegenüber intermolekularen Wechselwirkungen abzuschirmen vermögen bzw. mit diesen konkurrieren (Jaenicke und Rudolph, 1989; Rudolph und Lilie, 1996). Auch die Löslichkeit der Proteine wird dadurch positiv beeinflusst.

Proteinfaltung in reversen Micellen (Einsatz von Tensiden) ist ein weiterer Ansatz zur erfolgreichen Minimierung von Aggregationsreaktionen (Hagen et al., 1990; Zardeneta und Horowitz, 1994).

Rozema et al. (1996) verwendeten für die Renaturierung von Carboanhydrase B eine Kombination aus einem Detergenz und einem Cyclodextrin ("artificial chaperones"). Das Detergenz bildet mit dem entfalteten Protein einen Komplex, der Aggregation verhindert. Das später zugegebene Cyclodextrin seinerseits entfernt aufgrund seiner hohen Affinität zum Detergenz dieses vom Protein, das daraufhin zu seiner aktiven Konformation gelangen kann.

Auch Chaperone (z.B. groES, groEL) wurden zur *in vitro* Proteinfaltung eingesetzt (Goloubinoff et al., 1991; Jaenicke, 1995). Dabei fungierten diese als Schutz vor Aggregation und nicht als Reparaturmoleküle für falsch gefaltete Proteine.

Die Immobilisierung von Trypsinogen und Trypsin an festen Matrices (kovalente Bindung an Agarose bzw. Sepharose) mit anschließender Rückfaltung unter Vermeidung von Aggregation wurde von Sinha und Light (1975) und Light (1985) beschrieben.

Eine andere Möglichkeit der Immobilisierung besteht in der Expression des Zielproteins mit einem Affinitätsliganden als Fusionsanteil (z.B. Arg₆, His₆). Dieses Fusionsprotein läßt sich bei der Aufarbeitung an eine entsprechende Matrix binden und unter geeigneten Bedingungen zur nativen Struktur renaturieren (Stempfer et al., 1996).

Gelfiltration als Werkzeug zur Gewinnung biologisch aktiver Proteine ist bisher noch wenig beschrieben worden (Werner et al., 1994; Batas et al., 1996; Chaudhuri et al., 1996; Gauthier und Patston, 1997). Dabei wird besonders die geringe Tendenz der Moleküle zur Aggregation bei gleichzeitigem Einsatz hoher Konzentrationen an denaturiertem Protein hervorgehoben. Verunreinigungen lassen sich auf diese Weise ebenfalls gleichzeitig abtrennen, wenn die Molekülgrößendifferenz groß genug ist. Verschiedene monomere Proteine mit und ohne Disulfidverbrückungen wurden so erfolgreich renaturiert. Werner et al. (1994) berichteten sogar über die erfolgreiche Rückfaltung und Oligomerisierung von IHF (integration host factor) aus *E. coli* unter Zuhilfenahme eines 30 bp langen DNA-Stückes als Affinitätsligand.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgen Hamaker et al. (1996). Für die Renaturierung des Leukozyten Protease Inhibitors (rSLPI) wurde eine textile Matrix mit einer Ausschlußgröße von 3000 Da verwendet, die aufgerollt in einer Chromatographiesäule eine hohe mechanische Stabilität besitzt und bei Flußraten von $6000 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ keinerlei Kompression der Packung zeigt bei gleichbleibender Trennleistung. Allerdings wurde Aggregation beobachtet, die die Ausbeute auf 46 % verringerte.

Die meisten technischen Prozesse zur Renaturierung nutzen die Verdünnungsmethode oder die cross-flow-Filtration (Datar et al., 1993; Ernst et al., 1997).

2.4 Theorie der Gelfiltration

Die Begriffe Gelfiltration, Gelpermeationschromatographie sowie Größenausschlußchromatographie werden synonym verwendet und bezeichnen die Trennung von Analytmolekülen nach deren Größe. Das Trennprinzip beruht auf unterschiedlich langen Verweilzeiten der Spezies in der Gelpackung. Diese ist porös und besitzt eine diskrete Porengrößenverteilung, so daß größenabhängig eine Diffusion in die Porenstruktur stattfinden kann. Große Moleküle sind dazu weniger gut in der Lage als kleine und eluieren somit zuerst.

Ein Molekül, das vollständig von der Porendiffusion ausgeschlossen ist, befindet sich auf dem gesamten Weg durch die Säule in den Partikelzwischenräumen (Ausschlußvolumen V_0). Mit dem geometrischen Gesamtvolumen der Gelpackung (V_{gesamt}) läßt sich daraus der Anteil der Partikelzwischenräume (ϵ_0) berechnen:

$$\epsilon_0 = \frac{V_0}{V_{\text{gesamt}}} \quad (2.1)$$

Für eine kubisch dichteste Packung liegt dieser Wert bei 0,24 (Holleman und Wiberg, 1985). Chromatographiematerialien erreichen häufig einen Wert von 0,35 (Reiland, 1971). Damit ist das Volumen der stationären Phase ($V_{\text{stationär}}$) bestimmbar zu:

$$V_{stationär} = (1 - \epsilon_0) \cdot V_{gesamt} \quad (2.2)$$

Das zur Verfügung stehende Porenvolumen (V_{pore}) läßt sich in guter Näherung als Elutionsvolumen eines kleinen Moleküls ermitteln (V_t), von dem man vollständige Penetration in die Matrix annimmt wie z.B. NaCl oder Aceton:

$$V_{Pore} = V_t - V_0 \quad (2.3)$$

Der Verteilungskoeffizient K_d gibt an, zu welchem Ausmaß die Analytmoleküle in die Matrix eindringen können. Dieser Wert ist unabhängig von der Säulengeometrie. Für die Berechnung sind nur die einfach zu bestimmenden Parameter V_0 , V_t und V_e (Elutionsvolumen des Analytmoleküls) notwendig:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2.4)$$

Der Term im Zähler ($V_e - V_0 = V_{p,e}$) gibt dabei das Porenvolumen an, das vom Analyten genutzt wird.

2.5 Theorie der Fluoreszenzeigenschaften von Proteinen

Die Messung der Fluoreszenz ist eine sehr empfindliche Analysemethode. Sie erfordert nur geringe Stoffmengen des Analyten. Das Auftreten von Fluoreszenz ist an das Vorhandensein von Fluorophoren gebunden. Dazu gehören aromatische oder heterocyclische Ringsysteme, deren Elektronenkonfiguration durch ein π -System gekennzeichnet ist, dessen Elektronen zu $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen befähigt sind (Welfle, 1996). In Proteinen trifft dies für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zu. Mit einem höheren molaren Extinktionskoeffizienten, Akzeptor-

eigenschaften für emittiertes Licht der anderen aromatischen Aminosäuren sowie einer hohen Sensitivität der Quantenausbeute und des Emissionsmaximums gegenüber der Mikroumgebung des Indolrestes nimmt Tryptophan dabei eine Sonderstellung ein (Eftink und Shastry, 1997). Insbesondere letztgenannte Eigenschaft macht die Fluoreszenzspektrometrie zu einem wichtigen Instrument zur Untersuchung der Proteinfaltung. In wäßriger Umgebung liegt das Emissionsmaximum von Tryptophan bei $\lambda_{\max} = 340 - 350$ nm. Diese Bedingungen sind im allgemeinen für entfaltete Proteine gegeben. Demgegenüber ist das Emissionsmaximum für einen Tryptophanrest in unpolarer, hydrophober Umgebung hypsochrom verschoben ($\lambda_{\max} = 308 - 340$ nm). Derartige Bedingungen sind vielfach bei gefalteten Proteinen anzutreffen, wo ein Tryptophanrest im Innern des Moleküls verpackt ist.

Neben dem Effekt der Wellenlängenverschiebung des Emissionsmaximums treten abhängig von den Umgebungsbedingungen vor allem große Unterschiede in der Fluoreszenzintensität auf. Ursachen hierfür sind die Sensitivität der Quantenausbeute und die mögliche Anwesenheit fluoreszenzlöschender Moleküle oder Molekülteile. Besonders Disulfide sind in der Lage, Tryptophanfluoreszenz auszulöschen (Cowgill, 1967). Aber auch protoniertes Histidin, die Peptidbindung, einige Metallionen etc. besitzen diese Fähigkeit (Eftink und Shastry, 1997).

2.6 Mathematische Ansätze zur Kinetik

2.6.1 Geschwindigkeitsgesetze

Für eine irreversible Reaktion der Form



mit	A, B bzw. a, b	Komponente A bzw. B
	ν	stöchiometrischer Faktor

läßt sich die zeitliche Änderung der Komponente A in einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung wie folgt schreiben:

$$r = -\frac{d[A]}{dt} = |\Sigma v_a| \cdot k_1 \cdot [A] \quad \text{bzw.} \quad \ln[A] = \ln[A]_0 - |\Sigma v_a| \cdot k_1 \cdot t \quad (2.6)$$

differentiell

integriert

mit	r	Reaktionsgeschwindigkeit	[mol·l ⁻¹ ·s ⁻¹]
	[A]	Konzentration der Komponente A	[mol·l ⁻¹]
	[A] ₀	Anfangskonzentration der Komponente A	[mol·l ⁻¹]
	k ₁	Geschwindigkeitskonstante 1.Ordnung	[s ⁻¹]
	t	Zeit	[s]

Analog kann für eine irreversible Reaktion der Form



die zeitliche Änderung der Komponente A in einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung formuliert werden:

$$r = -\frac{d[A]}{dt} = |\Sigma v_a| \cdot k_2 \cdot [A]^2 \quad \text{bzw.} \quad \frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + |\Sigma v_a| \cdot k_2 \cdot t \quad (2.8)$$

differentiell

integriert

mit	k ₂	Geschwindigkeitskonstante 2.Ordnung	[l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]
-----	----------------	-------------------------------------	---

Die Geschwindigkeitskonstanten k₁ und k₂ können durch graphische Auftragung von ln [A] gegen t bzw. [A]⁻¹ gegen t aus der Steigung der resultierenden Geraden unter Berücksichtigung des stöchiometrischen Faktors berechnet werden.

2.6.2 Bestimmung der Reaktionsordnung

2.6.2.1 Graphische Auftragung

Die Ordnung einer Reaktion lässt sich in einfacher Weise durch Einsetzen der experimentellen Daten in die Geschwindigkeitsgesetze abschätzen. Resultiert bei der graphischen Auftragung der integrierten Formen für die Anfangswerte eine Gerade, so ist dies ein erster Hinweis auf die Reaktionsordnung.

2.6.2.2 Die Umsatzmethode

Die Definition des Umsatzes

$$U = 1 - \frac{[A]_t}{[A]_0} \quad (2.9)$$

mit U Umsatz $[-]$
 $[A]_{t,0}$ Konzentration der Komponente A zur Zeit $t = t$
 bzw. $t = 0$ $[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$

in Kombination mit den Geschwindigkeitsgesetzen 1. und 2. Ordnung liefert:

$$U = 1 - e^{(-|v_a| \cdot k_1 \cdot t)} \quad \text{bzw.} \quad U = 1 - \frac{1}{1 + |\Sigma v_a| \cdot k_2 \cdot [A]_0 \cdot t} \quad (2.10)$$

Reaktion 1. Ordnung

Reaktion 2. Ordnung

Aus Gleichung 2.10 ist ersichtlich, daß der zeitliche Verlauf des Umsatzes bei einer Reaktion 1. Ordnung unabhängig von der Anfangskonzentration $[A]_0$ ist, während für eine Reaktion 2. Ordnung eine solche Abhängigkeit besteht.

2.6.2.3 Die Differentialmethode

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Reaktionsordnung ergibt sich aus dem differentiellen Geschwindigkeitsgesetz (Gln. 2.6 und 2.8). Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit kann näherungsweise der Differenzenquotient anstelle des Differentialquotienten verwendet werden. Mit zwei Konzentrations-Geschwindigkeitswertepaaren wird die Ordnung der Reaktion erhalten (Schwetlick et al., 1989):

$$n = \frac{\log \frac{r_1}{r_2}}{\log \frac{[A]_{0,1}}{[A]_{0,2}}} \quad (2.11)$$

Mit	n	Reaktionsordnung	[-]
	r	Reaktionsgeschwindigkeit	[mol·l ⁻¹ ·s ⁻¹]
	1,2	Wert 1 bzw. 2	

Günstiger ist die Berechnung einer größeren Anzahl r-[A] - Wertepaare und deren Auftragung log r gegen log [A]. Der Anstieg der Geraden liefert dann die Reaktionsordnung n. Diese Methode wird vorwiegend auf den Start der Reaktion angewandt.

2.6.3 Gleichgewichtsreaktionen

Für eine reversible Reaktion erster Ordnung der Form



lautet das Geschwindigkeitsgesetz für die Komponente A:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1 \cdot [A] + k_{-1} \cdot [B] \quad (2.13)$$

mit k_1, k_{-1} Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion $[s^{-1}]$

Mit der Annahme, daß zum Zeitpunkt $t = 0$ ausschließlich das Edukt A vorliegt, gilt für $[A] = [A]_0$ und für $[B] = 0$. Aus der Massenbilanz $[A]_0 = [A] + [B]$ läßt sich $[B]$ ermitteln und in Gleichung 2.13 substituieren:

$$\frac{d[A]}{dt} = -(k_1 + k_{-1}) \cdot [A] + k_{-1} \cdot [A]_0 \quad (2.14)$$

Integration von Gl. 2.14 in den Grenzen $[A] = [A]_0$ zur Zeit $t = 0$ und $[A] = [A]$ zur Zeit $t = t$ und Umformen liefert für den zeitlichen Verlauf der relativen Konzentration der Komponente A folgenden Ausdruck (Capellos und Bielski, 1972):

$$\frac{[A]}{[A]_0} = \frac{1}{k} \cdot \left[k_{-1} + k_1 \cdot e^{(-k \cdot t)} \right] \quad (2.15)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} wurden dabei zu $k = k_1 + k_{-1}$ zusammengefaßt.

2.6.4 Aggregationsreaktionen

Die quantitative Beschreibung von Aggregationsreaktionen nach Kiefhaber et al. (1991) enthält folgende Annahmen:

1. Die Faltung ist durch Reaktionen erster Ordnung bestimmt, die Aggregation hingegen durch Reaktionen zweiter Ordnung.
2. Sämtliche Aggregate enthalten die gleiche Anzahl X an Faltungsintermediaten.

Ausgehend von vollständig denaturierten Proteinen gilt:

$$r = \frac{d[A]}{dt} = -(k_1 \cdot [A] + k_2 \cdot X \cdot [A]^2) \quad (2.16)$$

Der Ausdruck $k_2 \cdot X$ wird dabei zu der scheinbaren Geschwindigkeitskonstante K_2 der Aggregation zusammengefaßt. Die Integration von Gl. 2.16 in den Grenzen $[A]_0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ und $[A]$ zur Zeit $t = t$ liefert:

$$\frac{[A]}{[A]_0} = \frac{e^{(-k_1 \cdot t)}}{1 + \frac{[A]_0 \cdot K_2}{k_1} \cdot (1 - e^{(-k_1 \cdot t)})} \quad (2.17)$$

Für die Konzentration der nativen Spezies [N] gilt folgender Zusammenhang mit [A]:

$$[N] = k_1 \cdot \int_0^t [A] dt \quad (2.18)$$

Zum Zeitpunkt $t = 0$ sei $[N] = 0$. Integration und Substitution in Gl. 2.17 liefert:

$$\frac{[N]}{[A]_0} = \frac{k_1}{[A]_0 \cdot K_2} \cdot \ln \left(1 - \frac{[A]_0 \cdot K_2}{k_1} \cdot \left(1 - e^{(-k_1 \cdot t)} \right) \right) \quad (2.19)$$

Aus Gl. 2.19 ist ersichtlich, daß die Ausbeute an nativem Protein mit zunehmender Anfangskonzentration nach unendlich langer Reaktionszeit abnimmt. Es gilt für die Ausbeute y :

$$y = \frac{[N]}{[A]_0} = \frac{k_1}{[A]_0 \cdot K_2} \cdot \ln \left(1 + \frac{[A]_0 \cdot K_2}{k_1} \right) \quad (2.20)$$

2.6.5 Konzentrationsanaloge Größen

Konzentrationsabhängige physikalische Meßgrößen wie z.B. die Fluoreszenzintensität lassen ebenfalls eine kinetische Auswertung zu. Mit den Intensitäten zu Beginn ($t=0$), während ($t=t$) und am Ende ($t=\infty$) der Messung (I_0 , I und I_∞) lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten aus den Geschwindigkeitsgesetzen berechnen (Schwetlick et al., 1989). Dabei gilt für eine Reaktion erster Ordnung:

$$\ln \frac{I_{\infty} - I_0}{I_{\infty} - I} = |v_a| \cdot k_1 \cdot t \quad (2.21)$$

und für eine Reaktion zweiter Ordnung:

$$\frac{I - I_0}{I_{\infty} - I} = [A]_0 \cdot |v_a| \cdot k_2 \cdot t \quad (2.22)$$

Die Fluoreszenzintensität I_{∞} lässt sich dabei durch Extrapolation der experimentellen Werte mit einer geeigneten Funktion erhalten.

3. Material und Methoden

3.1. Produktion von PDGF

3.1.1 Mikroorganismus und Vektorsystem

Für die Produktion von PDGF wurde der nicht pathogene Laborstamm *Escherichia coli* TG1 mit folgender Charakterisierung: (lac-pro), supE, thi/F'proA+B+, lacIq, lacZ M15 verwendet (Sambrook et al., 1989; Hacker et al., 1991). Dieser Stamm wird unter der Nummer 6056 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig geführt.

Als Vektor wurde zum einen ein bicistronisches Konstrukt mit den beiden muren humanen PDGF-Ketten A und B auf der Basis des pCytexP3 - Expressionssystems eingesetzt (Schnepp et al., 1994). Das Konstrukt pBS/PDGF-BA2 erlaubt dabei ein Syntheseverhältnis der beiden PDGF-Ketten von 1:1. Ferner wurden die Konstrukte pBS/PDGF-A und pBS/PDGF-B für die einzelnen Ketten verwendet. Neben den Strukturgenen, dem $\lambda P_R P_L$ -Promoter und dem temperatursensitiven cl 857-Repressor enthält dieses Expressionssystem ein Ampicillinresistenzgen.

Die Transformation der Plasmide erfolgte nach der Methode der Elektroporation (Dower et al., 1988).

3.1.2 Stammhaltung

Die transformierten Stämme wurden in Form von Glycerinkulturen bei -70°C gelagert. Dazu wurde ein definiertes Volumen einer exponentiell wachsenden Kultur mit einem äquivalenten Volumen 87%igen Glycerins versetzt.

3.1.3 Kultivierung

Das Zellmaterial aus den Glycerinkulturen wurde auf eine Agarplatte mit LB-Medium (Tab.2.1) und Ampicillin überführt und für zwei Tage bei 30°C bebrütet. Die Vorkultivierung geschah in 10 ml Flüssigkultur (LB-Medium, 30°C, 120 upm, 10 -14 h). Als Inokulum für die Hauptkultivierung wurde daraufhin eine zweite Vorkultur in Minimalmedium (Tab.2.2) angezüchtet (Animpfen mit 1% LB-Vorkultur, 30°C, 120 upm, 12 h).

Tab. 2.1: Zusammensetzung LB-Medium (Agarplatten)

Komponente	Konzentration [g·l ⁻¹]
Bacto-Trypton (Fa. Difco)	10
Hefeextrakt (Fa. Difco)	5
NaCl	7
Agar (Fa. Difco)	15

Tab.2.2: Zusammensetzung Minimalmedium

Komponente	Konzentration Batch [g·l ⁻¹]	Konzentration Feed [g·l ⁻¹]
Glucose H ₂ O	30,0 (Vorkultur: 10,0)	875,0
MgSO ₄ 7 H ₂ O	1,20	20,00
KH ₂ PO ₄	13,30	222,61
(NH ₄) ₂ PO ₄	4,00	107,49
Citronensäure · H ₂ O	1,70	--
Fe ^{III} - Citrat	0,10	0,04
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	2,5 · 10 ⁻³	4,0 · 10 ⁻³
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	15,0 · 10 ⁻³	23,5 · 10 ⁻³
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,5 · 10 ⁻³	2,30 · 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	3,0 · 10 ⁻³	4,7 · 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,1 · 10 ⁻³	4,0 · 10 ⁻³
Zn(CH ₃ COO) ₂	33,8 · 10 ⁻³	16,0 · 10 ⁻³
EDTA	14,1 · 10 ⁻³	13,0 · 10 ⁻³
Thiamin	4,5 · 10 ⁻³	--
Ampicillin	50,0 · 10 ⁻³	--

Die Produktion von PDGF erfolgte im Hochzelldichteverfahren (50 l Maßstab) nach der Methode von Korz et al. (1995) auf Minimalmedium (Tab.2.2). Dieses Verfahren liefert durch eine exponentiell geführte Zufütterung der C-Quelle hohe Zelldichten (bis 150 g l⁻¹ Biotrockenmasse).

Der Bioreaktor (Fa. Braun) war neben den Standardsonden zur Messung von pH-Wert, Temperatur, pO₂, Leitfähigkeit und Schaumentwicklung mit einer Abgasanalytik ausgerüstet. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auf 20% Sättigung geregelt. Die pH-Regulierung erfolgte über Zugabe von 25%iger Ammoniaklösung auf pH 6,7. Nach der Batch-Phase wurde mit der Zufütterung begonnen. Mit Erreichen einer optischen Dichte ($\lambda = 600$ nm) von 100 erfolgte die Induktion der PDGF-Synthese durch Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C. Der typische Verlauf einer Hochzell-dichtekultivierung ist in Abb. 3.1 gezeigt. Zur Minimierung der Nebenproduktbildung

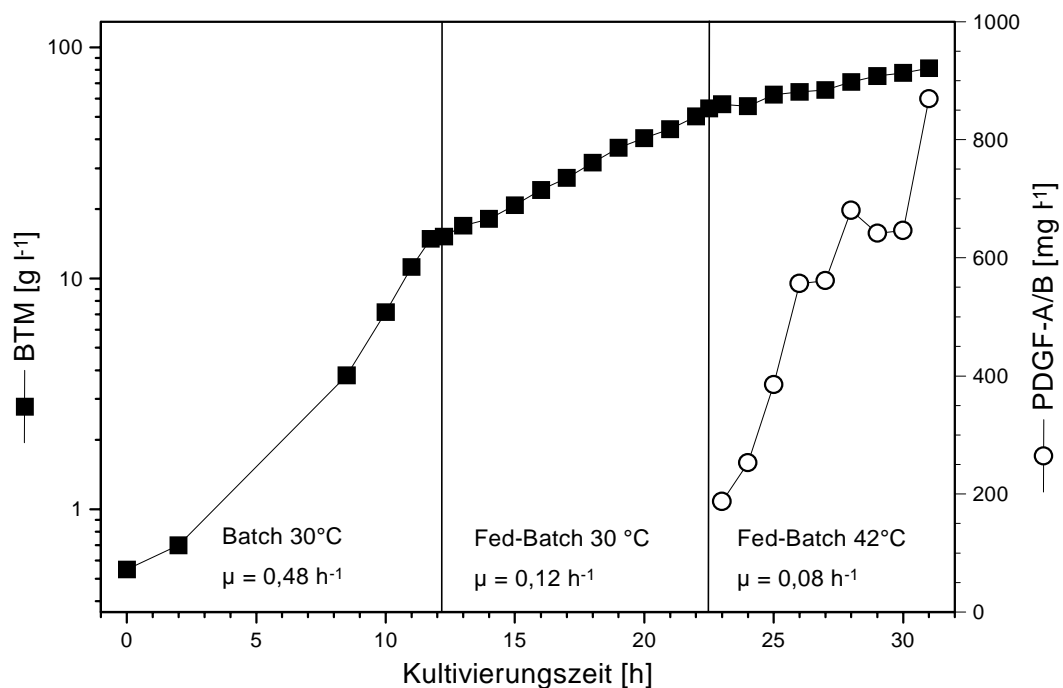


Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf einer Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* zur Produktion von PDGF-A/B.

(z.B. Acetat) wurde die Zufütterungsrate so gewählt, daß eine Wachstumsrate von 0,12 h⁻¹ für die erste Zufütterungsphase resultiert (μ_{set}). Zum Zeitpunkt der Induktion wurde die Wachstumsrate aus dem gleichen Grund weiter auf 0,08 h⁻¹ reduziert.

3.2 Primäraufarbeitung von PDGF

3.2.1 Zellaufschluß und Separation der Einschußkörper

Die Zellen aus der Hochzelldichtekultivierung (32 l Kultursuspension, 81 g·l⁻¹ BTM, 0,75 g·l⁻¹ PDGF-A/B, ca. 1,5% des Gesamtproteins) wurden direkt aus dem Bioreaktor zum Homogenisator (Modell SHL 05, Fa. Bran-Lübbe) gepumpt und dort bei 800 bar aufgeschlossen. Dabei erwies sich eine Passage (Flußrate 1 l·min⁻¹) als ausreichend. Darauf erfolgte eine 1:4 - Verdünnung des Homogenisates mit 50 mmol·l⁻¹ Natriumphosphatpuffer pH 7.0. Mit 75 l·h⁻¹ wurde das Homogenisat in einem Westfalia-Tellerseparator (Modell CSA 8) aufkonzentriert und bei -70°C gelagert. Es wurden 3,8 l Konzentrat mit einem PDGF-A/B - Gehalt von 4,4 g·l⁻¹ erhalten (ca. 10% des Gesamtproteins der unlöslichen Fraktion). Die Hauptverunreinigung der unlöslichen Fraktion bestanden aus Zellbruchstücken und anhaftenden Membranproteinen.

3.2.2 Extraktion kontaminierender Proteine

Zur Extraktion verunreinigender Proteine wurde das aus 3.2.1 erhaltene Konzentrat mit einem Waschpuffer bestehend aus 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,5), 0,5 mol·l⁻¹ EDTA und 2% Triton X-100 bzw. 2% Brij-35 versetzt. Dazu wurden 25 ml Konzentrat 1:4 mit dem Waschpuffer verdünnt und die Suspension zur Unterstützung des Waschprozesses unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (10 min, 250 W, Sonde 5T, Modell Labsonic U, Fa. Braun). Nach anschließender Zentrifugation (40 min, 4°C, 8500 g, Cryofuge 20-3, Rotor 7790, Fa. Heraeus Sepatech) wurde dieser Schritt zweimal wiederholt. Für den letzten Zentrifugationschritt (40 min, 4°C, 10000 g, Sorvall SS34, Fa. DuPont) wurde die Suspension in 25 ml Portionen (Nalgene Teflon Zentrifugenröhrchen) aufgeteilt und das resultierende Pellet anschließend bei -70°C gelagert.

Mit dieser Prozedur wurden 1,2 g·l⁻¹ PDGF-A/B (20-30% Anteil am Gesamtprotein der unlöslichen Fraktion) erhalten. Dabei war die Effizienz des Waschens für Triton X-100 etwas niedriger (ca. 20%) als für Brij-35 (ca. 30%).

3.2.3 Solubilisierung der Einschußkörper

Die gewaschenen Einschußkörper aus 3.2.2 wurden mit 5 ml Solubilisierungspuffer ($6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Guanidinium-Hydrochlorid (Gnd-HCl), $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Dithiothreitol (DTT), $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,5) unter Ultraschallbehandlung (5 min, 50 W, Sonde 40T, Modell Labsonic U, Fa. Braun) solubilisiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Weiterverarbeitung wurde 45 min bei 26000 g und 4°C zentrifugiert (Biofuge 28 RS, Rotor HFA 16.15, Fa. Heraeus Sepatech). Die lösliche Fraktion (96% des eingesetzten PDGF-A/B, 27% des Gesamtproteins) wurde abgenommen und für die nachfolgende Gelfiltration eingesetzt (PDGF-A/B: $5,76 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

3.3 Chromatographie

Sämtliche chromatographischen Aufreinigungsschritte wurden mit einem FPLC-System der Fa. Biorad (Modell BioLogic) mit Fraktionssammler (Modell 2128, Fa. Biorad) durchgeführt. Die Eluenten wurden mikrofiltriert (Porengröße: $0,1 \mu\text{m}$, Nitratcellulose-Membranfilter, Fa. Sartorius) und mittels Vakuumpumpe entgast. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3.1 Gelfiltration

3.3.1.1 Reinigung von PDGF unter denaturierenden Bedingungen

Um möglichst reines Ausgangsmaterial für den Renaturierungsschritt zu gewinnen, wurden die solubilisierten Einschußkörper einer Gelfiltration mit denaturierenden Bedingungen unterzogen. Dazu kam eine High LoadTM 26/60 Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule (Fa. Pharmacia) mit einem Bettvolumen von $V_{\text{gesamt}} = 348 \text{ ml}$ zum Einsatz. Das Superdex-Material zeichnet sich durch eine gute Auflösung für Proteine mit einer molaren Masse von 3 bis 70 kDa aus (mittlerer Partikeldurchmesser $34 \mu\text{m}$, Größenverteilung $24\text{-}44 \mu\text{m}$). Über zwei Pufferwahlventile wurden die Eluenten gewählt:

Eluent A: 4 mol·l⁻¹ Gnd-HCl

Eluent B: 0,1 mol·l⁻¹ Glycin/H₃PO₄ pH 3.0

Die Eluenten wurden in einem Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt (= 2 mol·l⁻¹ Gnd-HCl) und die Säule mit einer Flußrate von 2 ml·min⁻¹ bei Raumtemperatur equilibriert, bis die Gnd-HCl-Konzentration einen konstanten Wert erreicht hatte (refraktometrische Bestimmung nach Nozaki, 1972). Über eine Probenschleife wurde das Solubilisat injiziert.

3.3.1.2 Renaturierung von PDGF

Für den Renaturierungsschritt wurde die Säule mit folgendem Standard-Puffersystem equilibriert:

Eluent A: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8
4 mol·l⁻¹ Gnd-HCl

Eluent B: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8
10 mmol·l⁻¹ Glutathion reduziert (GSH)
0,25 mmol·l⁻¹ Glutathion oxidiert (GSSG)

Flußrate: 2 ml·min⁻¹

Nach dem Probenauftrag wurde für 10 ml mit einer Gnd-HCl-Konzentration von 2 mol·l⁻¹ gespült, um ein Eindringen der Proteinmoleküle in die Gelmatrix zu gewährleisten und so die Aggregation zu minimieren. Anschließend wurde über Veränderung der Pumpraten mit 0,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl eine Umgebung hergestellt, die eine Renaturierung zuläßt. Die Beladung der Säule betrug jeweils 1 ml (0,28% V_{gesamt}) mit einer PDGF-Konzentration von 2,5 mg·ml⁻¹. Das Eluat wurde in 2,5 ml Fraktionen aufgefangen und gelelektrophoretisch auf PDGF untersucht.

3.3.2 Feinreinigung von PDGF

Die Feinreinigung bestand im Wesentlichen aus der Trennung des renaturierten Dimers von nicht umgesetztem Monomer. Dazu wurde eine HiTrap™ Heparinsäule 5 ml (Fa. Pharmacia) eingesetzt.

Eluent A: 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7.0

Eluent B: 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,0
2 mol·l⁻¹ NaCl

Flußrate: 1 ml·min⁻¹

Es wurde für vier Säulenvolumina mit Eluent A equilibriert, anschließend über eine Probenschleife die Probe aufgetragen und für weitere vier Säulenvolumina mit Eluent A gespült. Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 mol·l⁻¹ NaCl über mindestens sechs Säulenvolumina mit Eluent B. Die Dimerfraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert (Abschnitt 3.4) und auf Reinheit und genaue Konzentration hin untersucht.

3.4 Konzentrieren und Umpuffern

Kleine Volumina bis 0,5 ml wurden in Microcon-3-Konzentratoren (Ausschlußgrenze: 3000 Da, Fa. Amicon) während 3 h bei 10000 g und 4°C (Biofuge A, Fa. Heraeus) auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht.

Volumina zwischen 5 und 15 ml wurden in Centriprep-3-Konzentratoren (Ausschlußgrenze: 3000 Da, Fa. Amicon) durch dreimaliges Zentrifugieren (95 min; 35 min; 10 min, 3000 g, 20°C; Omnifuge 2.0 RS, Fa. Heraeus) auf ein Endvolumen von 640 µl konzentriert.

Zum Umpuffern wurde das jeweilige Konzentrat mit dem neuen Puffer versetzt und die Zentrifugationsschritte wiederholt.

3.5 Derivatisierung der Cysteinreste

Zur Untersuchung der Dimerisierung der im nativen Zustand über zwei Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten von PDGF wurden die freien Thiolgruppen der Cysteinreste irreversibel acetyliert, so daß die Ausbildung von Disulfidbrücken nicht mehr stattfinden konnte. Als Acetylierungsreagenz wurde Iodessigsäure verwendet. Reaktive Spezies dieser nucleophilen Substitution ist das Thiolatanion. Die Halbwertszeit für diese Reaktion in Gegenwart von $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Iodessigsäure bei pH 8,7 und Raumtemperatur wurde zu 0,3 s bestimmt (Creighton, 1992).

Zur kinetischen Analyse der Dimerisierungsreaktion wurden 50 µl Probe (Eluat aus dem Renaturierungsschritt, Abschnitt 3.3.1.2) zu 50 µl $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Iodessigsäure gegeben und einige Sekunden gut vermischt (Vortex). Die Probenahme wurde zu Beginn (bis 6h) stündlich und später in größeren Zeitabständen vorgenommen. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Analyse via SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abschnitt 3.6.2.1) erfolgte bei 4°C.

3.6 Analytik

3.6.1 Analytik zur Hochzelldichtekultivierung

Das Zellwachstum wurde über die optische Dichte der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ verfolgt (Spektralphotometer Novaspec 2, Fa. Pharmacia LKB Biochrom).

Für die Biotrockenmassebestimmung wurden zweimal 1 ml Zellsuspension in vorgegebene Reaktionsgefäße (1,5 ml) gefüllt, 5 min bei 15000 g (Biofuge A, Fa. Heraeus) zentrifugiert, bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum Trockenschrank bei 40°C getrocknet und mit einer Analysenwaage ausgewogen.

Die PDGF-Konzentration wurde über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abschnitt 3.6.2.1) über einen mitgeführten Proteinstandard mittels Densitometrie ermittelt. Dazu wurden die Zellen auf eine optische Dichte von 4-6 (bezüglich der Kultivierung)

gebracht. Der Zellaufschluß erfolgte in 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,5), 0,5 mmol·l⁻¹ EDTA, 2% Triton X-100 unter Ultraschallbehandlung (Eiskühlung, 3 min, 50W, Sonde 40T, Modell Labsonic U, Fa. Braun). Nach Abtrennung der löslichen von der unlöslichen Fraktion (30 min Zentrifugation mit 10000 g, 4°C, Biofuge A, Fa. Heraeus) wurde letztere zweimal mit Ultraschallunterstützung im oben genannten Puffer gewaschen und dann bei -70°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Glucose und Stoffwechselprodukte wie organische Säuren wurden über HPLC bestimmt (Säule: Aminex HPX-87H, Fa. Biorad; Eluent: 5 mmol·l⁻¹ H₂SO₄; Flußrate: 0,5 ml·min⁻¹; 25°C).

Die Ammoniumionenkonzentration wurde mit einer gassensitiven Elektrode (Typ Orion 95-12, Fa. Colora) über ein pH-Meter (Typ 761 Calimatic, Fa. Knick) ermittelt. Die Bestimmung anorganischen Phosphates erfolgte photometrisch (Normenausschuß Wasserwesen, 1983).

3.6.2 Proteinanalyse

3.6.2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur eindimensionalen Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (1970) verfahren. Es kamen sowohl Gradientenfertiggele (ExcelGel™ gradient 8-18%, Fa. Pharmacia) als auch Gradientengele 9-16% aus Eigenherstellung (H: 160mm, B: 180mm, D: 1,5mm) zum Einsatz.

Zur Probenvorbereitung wurde ein Aliquot Probe mit einem Aliquot Auftragspuffer (7% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,25 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 0,0005% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Mit 10 bis 20 µl Probe pro Spur wurde das Gel beladen.

Sämtliche Proben der Kultivierung und Aufarbeitung wurden unter reduzierenden Bedingungen behandelt (Zusatz von 0,15 mol·l⁻¹ DTT zum Auftragspuffer). Die Proben der Renaturierung wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (ohne Zusatz von DTT). Die Gnd-HCl-Konzentration in den Proben wurde durch Verdünnung unter 0,1 mol·l⁻¹ gehalten.

Die Elektrophorese der Gele aus Eigenherstellung erfolgte im Gerät Protean II Multi-Cell (Fa. Biorad) mit 40-42 mA pro Gel, die der Fertiggele im Modell Multi Drive XL (Fa. Pharmacia LKB) mit 50 mA. Nach Fixierung, Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250, Entfärbung gemäß Arbeitsanweisung ExcelGel™ wurden die Gele in Wasser gelagert.

In einigen Fällen wurde eine zusätzliche Silberfärbung der bereits Coomassie-gefärbten Gele nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1985) vorgenommen.

Eine Quantifizierung von PDGF wurde über mitgeführte Proteinstandards (BSA) densitometrisch ($\lambda = 546 \text{ nm}$) erreicht (Elscrip 400, Fa. Hirschmann).

3.6.2.2 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-SDS-PAGE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgt die Proteintrennung nach zwei verschiedenen Gesichtspunkten. In einer ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt (isoelektrische Fokussierung). Darauf folgt ein Elektrophoreseschritt wie er in Abschnitt 3.6.2.1 beschrieben wurde (zweite Dimension). Die Kopplung dieser beiden Methoden liefert eine gute Trennleistung für Proteine ähnlicher molarer Masse.

Die isoelektrische Fokussierung von PDGF (isoelektrischer Punkt = 9,2-10,5; Abschnitt 2.1.2) wurde als Nichtgleichgewichtselektrophorese durchgeführt. Dabei bewegen sich die Proteine eine definierte Zeit im elektrischen Feld, ohne daß ein Gleichgewichtszustand erreicht wird.

50 µl aufgereinigtes, biologisch aktives PDGF-AB wurden bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:1 mit einem Lysispuffer ($9,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Harnstoff, 2 % (w/v) Nonidet P40, $0,72 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DTT, 2,5 % (w/v) Ampholine pH 3 - 10 (Fa. Biorad) und 2,5 % (w/v) Ampholine pH 3 - 10 der Fa. Serva) versetzt. 50 µl dieses Gemisches wurden auf ein Röhrchengel aufgetragen. Die Trennung erfolgte während 2,5 h bei 500 V (175 Tube Gel Chamber, Fa. Biorad). Das Röhrchengel wurde anschließend auf ein SDS-Gel aus Eigenherstellung übertragen und dann wie in Abschnitt 3.6.2.1 verfahren.

3.6.2.3 Blotting

Zur Sequenzanalyse wurden verschiedene Proben hochkonzentriert auf ein Gel (9-16%) aufgetragen. Nach Ende des Elektrophorese wurden die Proteine auf eine mit Towbin-Puffer (25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8, 192 mmol·l⁻¹ Glycin, 20% (v/v) Methanol) getränkte Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Immobilon-P^{sq}, Fa. Millipore) durch Elektroblothing in einer Semidry-Anlage (15 V, 42 min; Transblot SD, Fa. Biorad) übertragen. Nach der Färbung (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 1% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol), Entfärben und Trocknung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zur Sequenzierung (Abschnitt 3.6.2.4) eingesetzt.

3.6.2.4 Aminoterminal Sequenzierung

Die Identifizierung von PDGF sowie die genaue Konzentrationsbestimmung zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte durch N-terminale Sequenzierung (Modell 473A, Fa. Applied Biosystems). Dazu wurden sowohl Aliquote des Eluats der Renaturierung (Abschnitt 3.3.1.2) als auch Blottingproben verwendet (Abschnitt 3.6.2.3).

3.7 Fluoreszenzspektrometrie

Die Messung der intrinsischen Fluoreszenz zur Untersuchung von Faltung und Dimerisierung erfolgte in einem Lumineszenz-Spektrometer (Modell LS 50 B, Fa. Perkin Elmer) mit der Auswertesoftware FL-Winlab v. 2.0. Es kamen ausschließlich Quarzküvetten der Fa. Hellma zum Einsatz. Für die kinetischen Messungen konnten dabei über einen drehbaren Küvettenhalter (thermostatisierbar) bis zu vier Versuchsansätze parallel vermessen werden.

3.7.1 Stammlösungen

Für die systematische Variation der Versuchsbedingungen wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

PDGF-A/B: 1,2 mg·ml⁻¹ in 2 mol·l⁻¹ Gnd-HCl, 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8

Gnd-HCl: 6 mol·l⁻¹ in 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8

GSH: 0,1 mol·l⁻¹ in 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8

GSSG: 0,1 mol·l⁻¹ in 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8

Puffer: 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8

Die Lagerung der PDGF- sowie der Glutathion-Stammlösungen erfolgte bei -70°C.

3.7.2 Standardbedingungen

Es wurde folgende Parameterkombination als Standard definiert:

Temperatur:	25°C
PDGF-A/B:	10 µg·ml ⁻¹
Gnd-HCl:	0,5 mol·l ⁻¹
GSH:	10 mmol·l ⁻¹
GSSG:	0,25 mmol·l ⁻¹
Meßvolumen:	1,5 ml
Rührer:	Stufe "high"
Anregung:	$\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$
Emission:	$\lambda_{\text{em.}} = 350 \text{ nm}$ (Kinetik); $\lambda_{\text{em.}} = 280 - 400 \text{ nm}$ (Spektrum)
Spaltbreite:	3 nm (Anregung) / 10 nm bzw. 5 nm (Emission)

3.7.3 Kinetische Messungen

3.7.3.1 Dimerisierung

Zur Untersuchung der Dimerisierung wurden jeweils 0,65 ml-Aliquote aus dem Renaturierungsschritt (Abschnitt 3.3.1.2) eingesetzt. Nach Aufnahme eines Spektrums wurde die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aufgezeichnet (1 Meßpunkt pro Minute). Am Ende der Messung wurde wiederum ein Spektrum aufgenommen.

3.7.3.2 Renaturierung nach der Verdünnungsmethode

Die in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen Pufferlösungen wurden zunächst ohne Protein zusammengegeben und für 5 min im Fluoreszenzspektrometer temperiert. Daraufhin wurde die Proteinlösung zugegeben und gemischt. Es wurde sofort ein Spektrum der Versuchsansätze aufgezeichnet und anschließend der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität verfolgt (1 Meßpunkt pro Minute). Am Ende der Messung wurde wiederum ein Spektrum aufgenommen. Zur Abtrennung gebildeter Aggregate wurden die Ansätze filtriert (Ausschlußgrenze 100 kDa, Microcon-100-Konzentratoren) und vom Filtrat erneut ein Spektrum aufgezeichnet.

3.8 Streulichtmessung

Parallel zur Fluoreszenzmessung erlaubte das Spektrometer die Messung des an den Proteinaggregaten gestreuten Lichtes (90° Winkel). Dabei wurde das Streulicht bei $\lambda_{\text{em.}} = 280 \text{ nm}$ registriert (Rayleigh-Streuung).

3.9 Charakterisierung von PDGF

3.9.1 MALDI-Massenspektroskopie

Die Massenspektrometrie wird seit der Verfügbarkeit schonender, nicht zersetzender Ionisierungsverfahren in zunehmendem Maße auch zur Untersuchung von Proteinen angewendet. Sie liefert Aussagen zur molaren Masse sowie über Heterogenitäten der Proteinmoleküle (z.B. posttranslationale Modifizierungen) und benötigt geringe Substanzmengen. Natives PDGF-AB wurde mit der Methode der matrixunterstützten Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) ionisiert (Stickstofflaser mit $\lambda = 337 \text{ nm}$) und mit einem Flugzeitenanalysator (TOF) registriert. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde PDGF-AB in einer Konzentration von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gegen $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammoniumacetat pH 7,0 bei 4°C dialysiert. $1 \mu\text{l}$ wurden daraufhin auf die feste Matrix gebracht und in einem ReflexTM MALDI/TOF-Massenspektrometer (Fa. Bruker-Franzen-Analytik) analysiert.

3.9.2 Biologischer Aktivitätstest

Die mitogene Aktivität von PDGF wurde über die *in vitro* - Stimulierung der DNA-Synthese von Maus Balb/c 3T3 - Embryonalzellen, gemessen durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide, bestimmt (Klagsbrun, 1977; Antoniades, 1979).

Die Zellen wurden in supplementiertem DMEM-Medium (Dulbeccos modified eagle medium, bestehend aus $4,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose, 10% Kälberserum, $292 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ L-Glutamin, 1000 U Penicillin G, $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Streptomycinsulfat) bis zur Konfluenz herangezogen und ausgehungert (2000 Zellen pro $200 \mu\text{l}$ Medium; entspricht 1 Mikrotiterwell).

Die Stimulierung erfolgte in Dreifachansätzen durch Zugabe unterschiedlicher PDGF-Konzentrationen ($0,5$ bis $40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Endkonzentration). Zusätzlich wurde eine negative Kontrolle ($50 \mu\text{l}$ phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, PBS) sowie eine positive Kontrolle ($50 \mu\text{l}$ 20%iges Kälberserum) mitgeführt. Nach Zugabe von $10 \mu\text{l}$ ^3H -Thymidin ($3,7\cdot 10^7 \text{ Bq}\cdot\text{ml}^{-1}$ [methyl - ^3H]-thymidine Code TRA,120 Batch 392, Fa. Amersham, 1:20-Verdünnung in PBS) pro Mikrotiterwell ($= 1,85\cdot 10^4 \text{ Bq pro well}$) und

Inkubation (36-48 h) bei 37°C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der DNA wurden zweimal für je 5 min 200 µl eiskaltes Methanol zugegeben, dann zweimal für jeweils 10 min 200 µl 5% eiskalte Trichloressigsäure (TCA) und schließlich einmal mit 200 µl deionisiertem Wasser gewaschen. Mit 150 µl 0,3 mol·l⁻¹ NaOH wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier Scintillator 299, Fa. Packard) wurde die Radioaktivität in einem Szintillator gemessen.

3.9.3 Untersuchung auf Endotoxine (LAL-Test)

Endotoxine sind bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien ein nicht zu unterschätzender Störfaktor. Es handelt sich dabei um hochmolekulare Komplexe aus einer Polysaccharid-, einer Protein- und einer Lipidkomponente, die beim Zellaufschluß freigesetzt und häufig mit dem Zielprotein kopurifiziert werden. Die toxische Komponente ist dabei die Polysaccharidgruppe. Bereits geringe Konzentrationen bewirken akutes Nierenversagen und Herzinsuffizienz. Grenzwerte für die Applikation eines Präparates in der Humantherapie sind abhängig von der Dosis, der Art der Verabreichung sowie dem Medikament selbst. Die zulässige Gesamtdosis Endotoxin für intravenöse Anwendungen liegt bei etwa 5 Endotoxineinheiten pro Kilogramm Körpergewicht (Müller-Calgan, 1989). Die empfindlichste Nachweismethode ist der Limulus Amöbocyt Lysat test (LAL). Bei Anwesenheit von Endotoxinspuren wird die Blutgerinnungskaskade des Pfeilschwanzkrebses *Limulus Polyphemus* aktiviert, die sich anhand gelbildender Peptide nachweisen läßt. Eine Modifikation dieses Tests unter Zuhilfenahme eines synthetischen Peptids mit fusioniertem Chromogen erlaubt die quantitative Erfassung der Endotoxine (COATEST® Endotoxin, Fa. Endosafe Inc.). Da Endotoxine sowohl frei als auch an Proteine komplexiert vorkommen können (maskiert), wurde zusätzlich eine Demaskierung durchgeführt. Diese geschah durch Inkubation der Probe mit Proteinase K für 24 - 48 h. Dabei wurde das Protein unspezifisch gespalten, woraufhin die Endotoxine gut zu analysieren waren (Petsch et al., 1998).

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Renaturierung von PDGF aus Einschlußkörpern von *E. coli* entwickelt. Dazu wurde die Technik der Gelfiltration gewählt. Diese erlaubt den Einsatz hoher Proteinkonzentrationen bei gleichzeitiger Minimierung von Aggregationsreaktionen (Abschnitt 2.3). Gegenüber der klassischen Renaturierung durch Verdünnung bietet die Gelfiltration zudem den Vorteil der *in situ* Abtrennung gebildeter Aggregate.

4.1 Reinigung solubilisierter PDGF-Einschlußkörper

Die solubilisierten Einschlußkörper wurden zunächst vor dem Renaturierungsschritt unter denaturierenden Bedingungen mittels Gelfiltration vorgereinigt, um den Einfluß kontaminierender Proteine bei der Rückfaltung weitestgehend auszuschließen. Maachupalli-Reddy et al. (1997) untersuchten den Effekt kontaminierender Proteine auf die Faltung bzw. die Ausbeute von Lysozym systematisch und fanden in Gegenwart von β -Galaktosidase und des bovinen Serumalbumins einen Ausbeuterückgang von 40 - 50%, während die Gegenwart von Ribonuclease A keine Auswirkungen erkennen ließ. Die Ausbeuteverluste wurden dabei der Bildung von Aggregaten zugeschrieben. In Abb. 4.1 ist ein Chromatogramm der denaturierenden Aufreinigung von PDGF dargestellt. Gezeigt ist die UV-Absorption als Funktion des Elutionsvolumens. Dabei eluiert PDGF unter den angegebenen Bedingungen bei 155 ml deutlich nach den höhermolekularen Verunreinigungen. Die für die Solubilisierung erforderlichen Zusätze EDTA und DTT werden ebenfalls effektiv abgetrennt. In der SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung wurde neben den PDGF-Banden keine weitere Proteinbande nachgewiesen, wie es in Abb. 4.2 (Spur 6) veranschaulicht ist. In Abb. 4.2 ist zusätzlich die Qualität der vorangegangenen Aufarbeitungsschritte vom Einschlußkörper-Rohkonzentrat bis zum

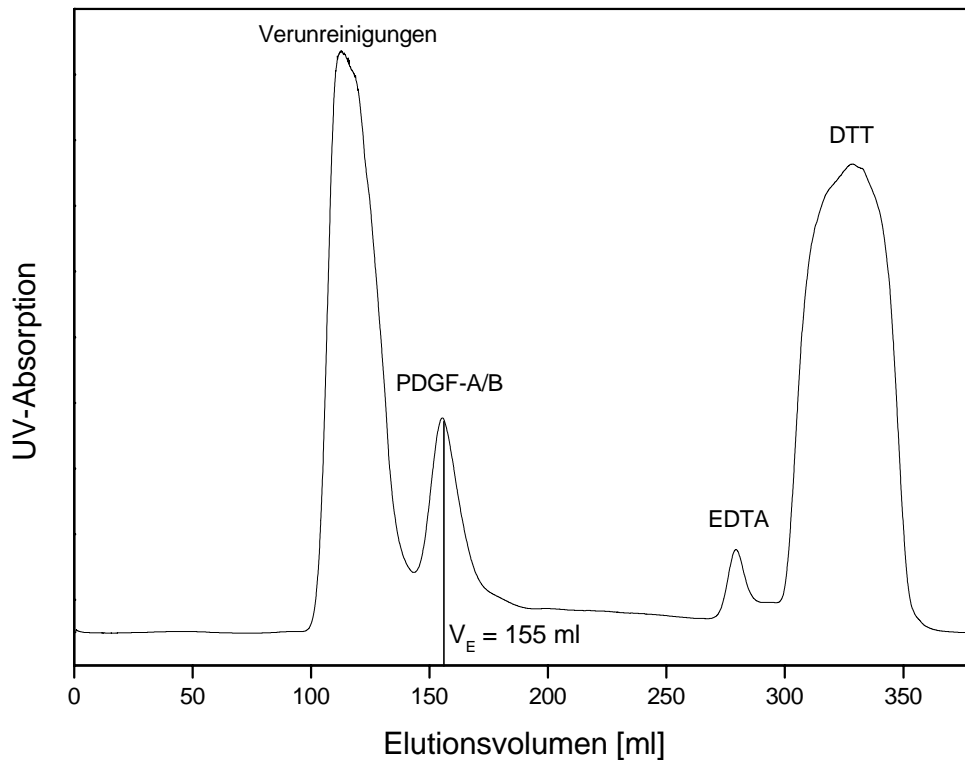


Abb. 4.1: Reinigung solubilisierter PDGF-A/B-Einschlußkörper. Puffersystem: $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Glycin/ H_3PO_4 pH 3,0; Gesamtprotein: $8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, davon PDGF-A/B: $1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; Flußrate: $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Probenauftrag: 10 ml.

hochreinen Ausgangsmaterial (ca. 95 %) für den Renaturierungsschritt zu sehen. Bei der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen erwies sich eine Gnd-HCl-Konzentration von $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ als ausreichend, um die denaturierten Polypeptidketten in Lösung zu halten.

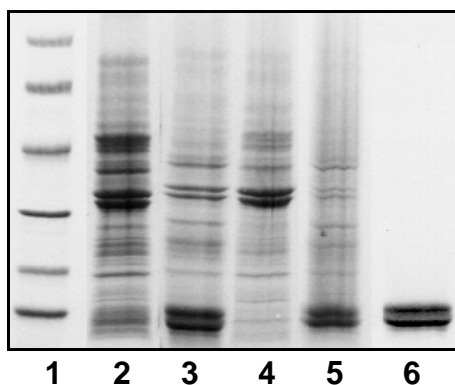


Abb. 4.2: SDS-PAGE - Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte. **1** Markerproteine (kDa): 94 (oben); 67; 43; 30; 20,1; 14,4; **2** Einschlußkörperrohkonzentrat; **3** unlösliche Fraktion nach zweimaliger Extraktion mit Triton X-100 (Abschnitt 3.2.2); **4** lösliche Fraktion nach zweimaliger Extraktion mit Triton X-100 (Abschnitt 3.2.2); **5** lösliche Fraktion nach Solubilisierung in $6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl (Abschnitt 3.2.3); **6** PDGF-A/B haltige Fraktion nach denaturierender Gelfiltration (siehe Abb. 4.1).

← PDGF-Monomere A (oben) und B (unten)

4.2 Methode zur Renaturierung von PDGF

4.2.1 Renaturierung von PDGF mittels Gelfiltration

Die Renaturierung von PDGF mittels Gelfiltration verläuft in zwei Stufen. Beide Stufen wurden hinsichtlich verschiedener Aspekte untersucht. Im folgenden wird zunächst der Gesamtprozeß zur Renaturierung vorgestellt, bevor detailliert auf die einzelnen Teilbereiche eingegangen wird.

Nach der Beladung der Gelfiltrationssäule mit denaturiertem und reduziertem PDGF wurde mit einem Puffer eluiert, der eine Renaturierung zuläßt und dem $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl sowie das Redoxsystem Glutathion in seiner reduzierten und oxidierten Form zugesetzt wurden. In Abb. 4.3 ist das Elutionsprofil für PDGF-A/B gezeigt.

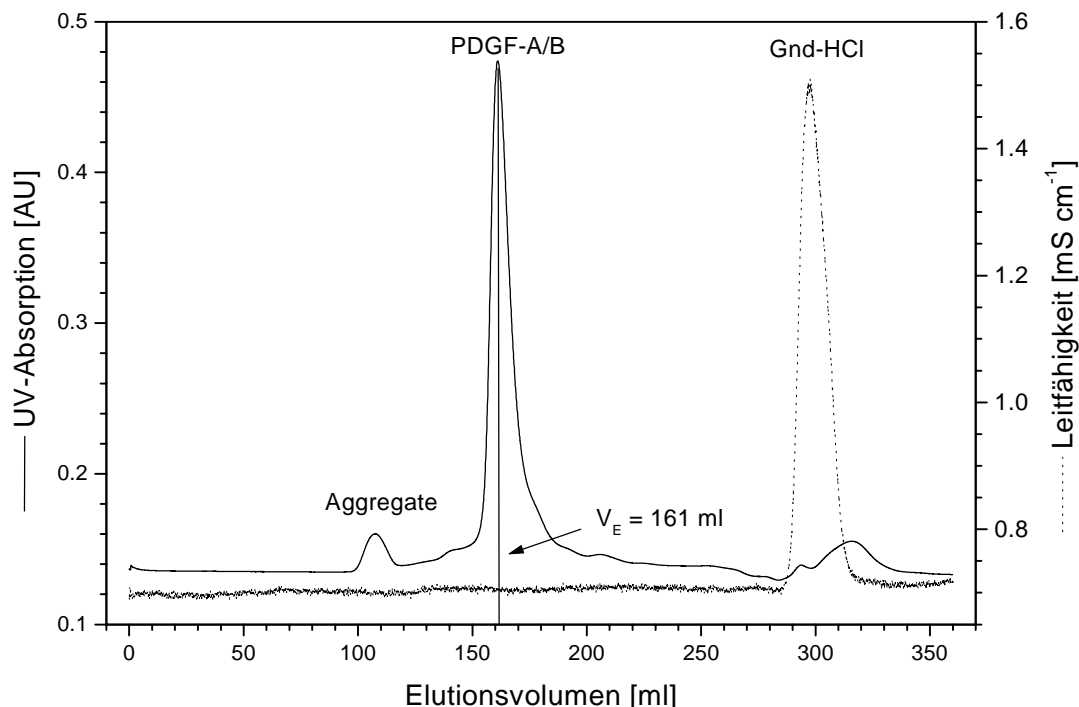


Abb. 4.3: Renaturierung von PDGF-A/B mittels Gelfiltration. PDGF-A/B: $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl; $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; Flußrate: $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Beladung: 1 ml.

Der Hauptpeak mit einem Elutionsvolumen von 161 ml enthielt monomeres PDGF (Abschnitt 4.2.1.1). Nachfolgend wurde in den aufgefundenen Fraktionen die Bildung von disulfidverbrückten PDGF-Dimeren beobachtet. Durch Abstoppen der Dimerisierungsreaktion als Funktion der Zeit mit anschließender SDS-PAGE - Analyse war es möglich, die Kinetik der Dimerbildung zu untersuchen (Abschnitt 4.2.2.1). Abb. 4.4

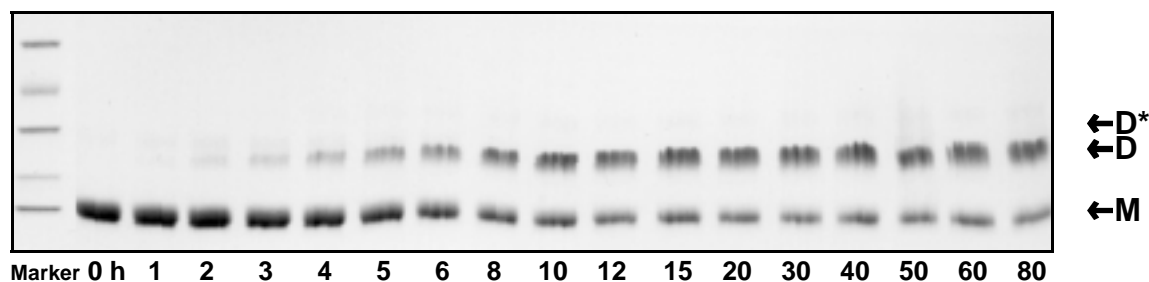


Abb. 4.4: Nichtreduzierende SDS-PAGE - Analyse der Dimerisierung von PDGF-A/B. Marker (kDa): 67 (oben); 43; 30; 20,1; 14,4; D: Dimer; D*: Dimere Spezies mit veränderter elektrophoretischer Mobilität (Abschnitt 4.2.2.1); M: Monomer

veranschaulicht diesen Befund. Nach der Elution der Monomere ($t = 0$ h) ist eine in ihrer Intensität zunehmende Bande im Dimerbereich zu erkennen. Komplementär dazu nimmt die Intensität der Monomerbande ab. Diese Dimerisierungsreaktion

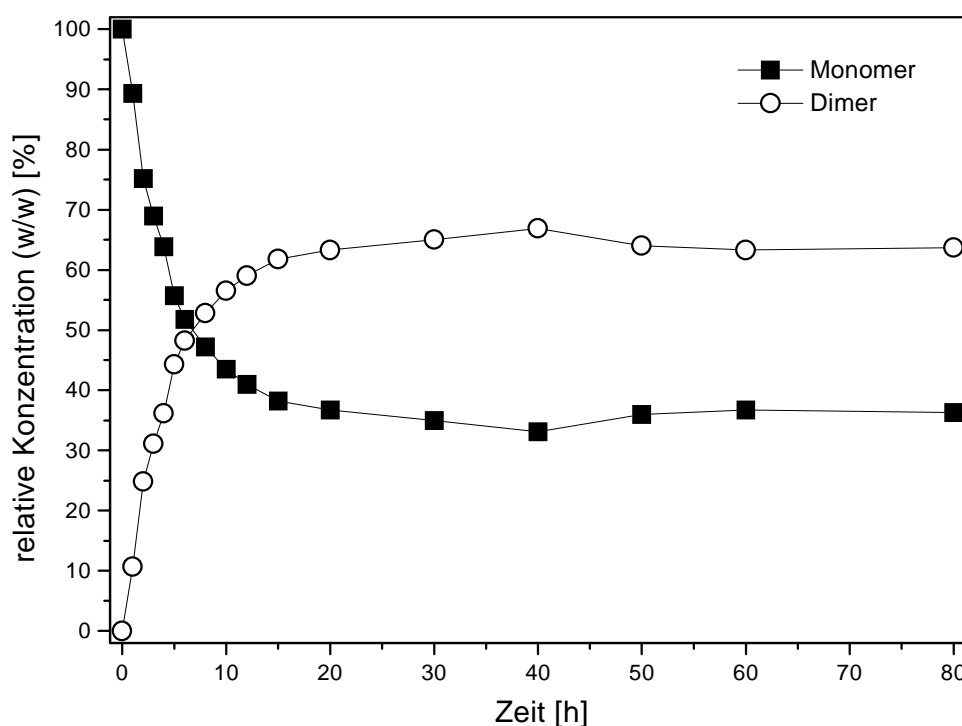


Abb. 4.5: Zeitlicher Verlauf der Monomer- und Dimermassenkonzentrationen der Dimerisierung von PDGF-A/B. PDGF-A/B: $110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$.

verläuft im Stundenbereich. Nach densitometrischer Analyse des Coomassie-gefärbten Gels wurden die relativen Massenkonzentrationen für die beiden Spezies erhalten. In Abb. 4.5 sind die zeitlichen Verläufe dargestellt. Beide Kurven zeigen einen typischen Sättigungsverlauf. Nach etwa 15 h wird jeweils ein konstanter Endwert erreicht. Die relative Konzentration der Dimere liegt dabei bei 64 % und ist von den Umgebungsparametern abhängig (Abschnitt 4.2.2.4).

Schematisch läßt sich der zweistufige Prozeß der Renaturierung von PDGF mittels Gelfiltration folgendermaßen zusammenfassen (Abb. 4.6).

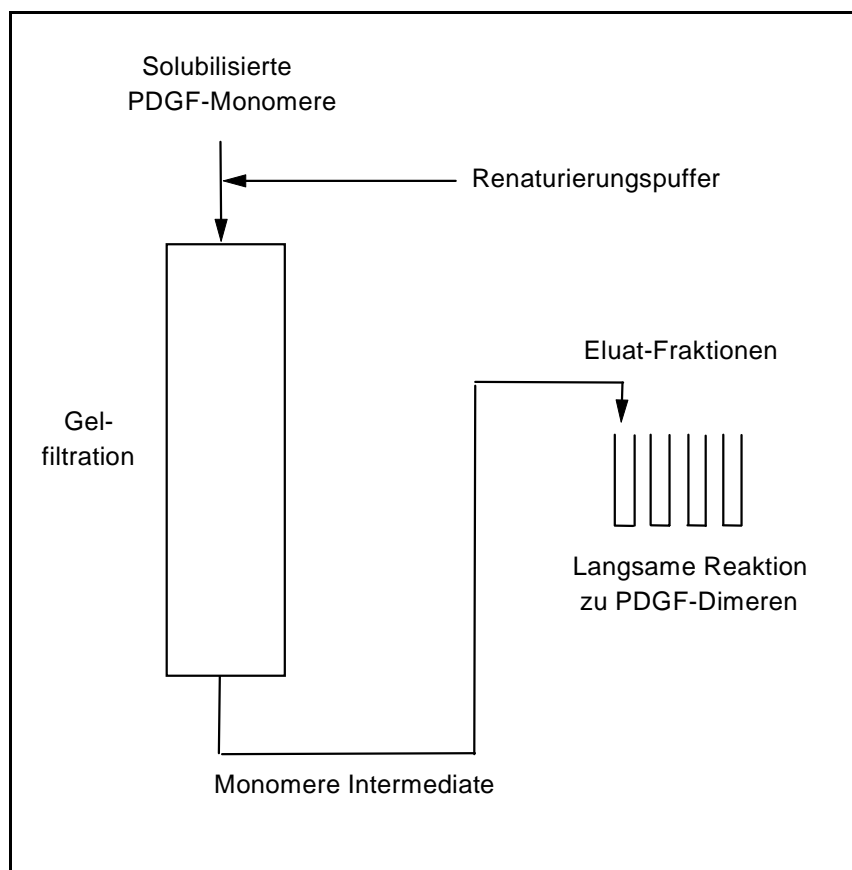


Abb: 4.6: Verfahrensschema zur Renaturierung von PDGF

Der Pufferaustausch während der Gelfiltration liefert monomere Faltungsintermediate, die nach Elution im Stundenbereich zu disulfidverbrückten biologisch aktiven Dimeren reagieren.

4.2.1 Chromatographische Aspekte der Renaturierung von PDGF

4.2.1.1 Zusammensetzung des Eluats

Zur Renaturierung wurden sowohl die PDGF-A und die PDGF-B-Kette separat als auch ein äquimolares Gemisch eingesetzt. Aufgrund der geringen Differenzen der molaren Massen der beiden Ketten zeigten diese dasselbe Verhalten in der Gelfiltration, so daß die Ergebnisse synonym behandelt werden können.

Das Elutionsvolumen des Hauptpeaks wurde zu $V_e = 161 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$ bestimmt. In den Fraktionen des vorgelagerten Peaks bei 108 ml (Ausschlußvolumen V_0) konnte ebenfalls nach Aufkonzentrieren und Silberfärbung des Gels PDGF nachgewiesen werden. Dieser Befund läßt sich mit der Bildung eines geringen Anteils von Aggregaten erklären, die als höhermolekulare Spezies früher eluieren. Das Auftreten von Aggregaten ist durch intermolekulare Wechselwirkungen der teilgefalteten Proteine in den Partikelzwischenräumen möglich (Batas et al., 1996).

Die Hauptpeakfraktionen enthielten fast ausschließlich monomeres PDGF. Dies konnte durch irreversible Blockierung der für die intermolekularen Disulfidbrücken notwendigen Thiolgruppen mittels Iodessigsäure sofort nach Elution gezeigt werden. Abb. 4.7 (Spur 3) verdeutlicht diesen Sachverhalt. Nach Aufkonzentrierung um den

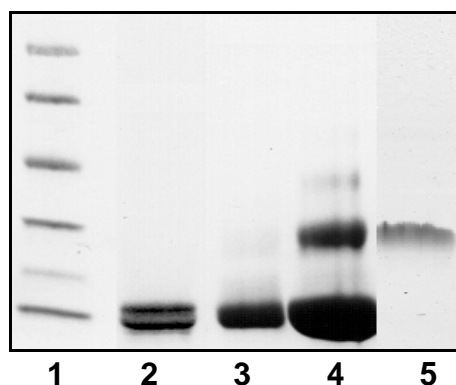


Abb. 4.7: SDS-PAGE - Analyse des Eluats.

1 Markerproteine (kDa): 94 (oben); 67; 43; 30; 20,1; 14,4;
2 Zur Renaturierung eingesetzte vorgereinigte PDGF-A/B-Monomere; 3 PDGF-A/B haltige Fraktion nach Elution bei Renaturierungsbedingungen (vgl. Abb. 4.3; $V_e = 161 \text{ ml}$); 4 wie Spur 3, 12fach konzentriert; 5 natives PDGF-AB.

← PDGF-AB-Dimer

← PDGF-A/B-Monomere

Faktor 12 war jedoch auch eine Bande im Dimerbereich zu beobachten (Spur 4). Das Auftreten dieses geringen Anteils an Dimer (ca. 5 %) ist möglicherweise einer Reaktion der Monomere in den Partikelzwischenräumen der Gelmatrix am unteren

Ende der Säulenpackung zuzurechnen. Eine Separation der Monomere und Dimere in Form getrennter Peaks ist dort nicht mehr möglich, so daß beide Spezies gleichzeitig eluieren.

4.2.1.2 Effekt der Renaturierungsparameter auf die Wiederfindung der Monomere

Die Renaturierung wurde für verschiedene Bedingungen durchgeführt. Dabei standen Variationen der Gnd-HCl - Konzentration und der Konzentrationen der Komponenten des Redoxsystems im Vordergrund. Tab. 4.1 faßt die wichtigsten Aspekte zusammen.

Tab. 4.1: Effekt der Renaturierungsparameter auf die Wiederfindung der Monomere während der Gelfiltration*

Gnd-HCl [mol·l ⁻¹]	Redoxbedingungen GSH, GSSG [mmol·l ⁻¹], Molares Verhältnis	Elutionsvolumen [ml]	Wiederfindung PDGF-Monomer [%]
0 **	5, 0,5, 10:1	194	50
0,25	10, 0,25, 40:1	168	68
0,5	10, 0,25, 40:1	161	83
0,5	5, 0,25, 20:1	161	83
0,5	5, 0,5 10:1	161	85
0,5	5, 1,0, 5:1	161	82

* Es wurden jeweils 2,5 mg·ml⁻¹ (200 µmol·l⁻¹) PDGF-Monomere eingesetzt.

** Zusatz von 0,5 mol·l⁻¹ NaCl

Die Bestimmung der Wiederfindung von PDGF in der Chromatographie erfolgte durch Peakintegration. Diese wurde in Gegenwart von 0,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl zu 84 % ± 6 % ermittelt. Eine Verringerung des Gnd-HCl - Gehaltes auf 0,25 bzw. 0 mol·l⁻¹ lieferte deutlich niedrigere Wiederfindungen bezüglich der PDGF-Monomere. Lediglich 50 % konnten bei Abwesenheit von Gnd-HCl und Zusatz von NaCl (zur Erhöhung der Ionenstärke) identifiziert werden. Allerdings wurde PDGF in Form von Aggregaten in der Durchbruchfraktion nachgewiesen. Die Anwesenheit von 0,25 mol·l⁻¹ Gnd-HCl ohne NaCl-Zusatz lieferte ein Chromatogramm, wie es in Abb. 4.8 gezeigt ist. Neben dem Hauptmonomerpeak bei 169 ml wurden weitere Peaks mit höheren Elutions-

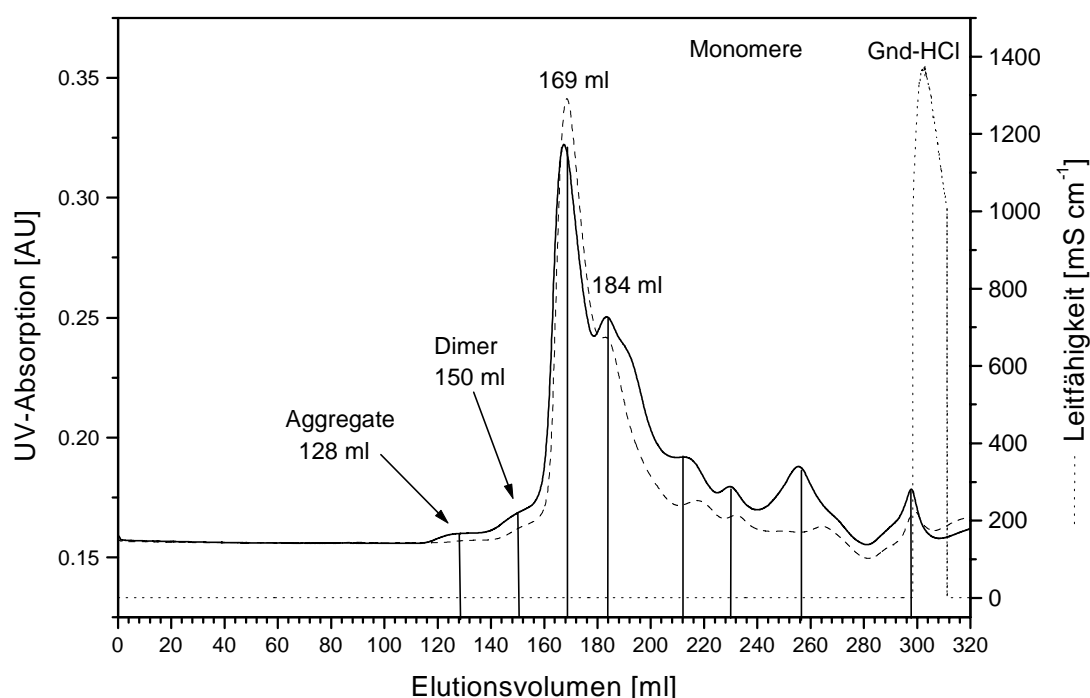


Abb. 4.8: Renaturierung mittels Gelfiltration von PDGF-A/B in Gegenwart von $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl. PDGF-A/B: $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$; Flußrate: $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Beladung: 1 ml ; die Verläufe (—) und (---) belegen die Reproduzierbarkeit.

volumina gefunden. Auch sie enthielten PDGF. Die PDGF-Monomere der Peakfraktionen bei 184 ml waren dabei ebenfalls dimerisierungsfähig. Eine Wiederholung der Chromatographie lieferte die gleichen Ergebnisse. Da zusätzlich zum Gnd-HCl kein weiteres Salz zur Erhöhung der Ionenstärke und damit zur Unterdrückung von Adsorptionseffekten eingesetzt wurde, ist es möglich, daß PDGF in unterschiedlichen Stärken an die Gelmatrix adsorbiert hat. Dieses Phänomen wurde jedoch nicht näher untersucht.

Die Variation der Redoxbedingungen zeigte keinen beobachtbaren Einfluß auf die Wiederfindung der PDGF-Monomere bei der Chromatographie (82-85%). Gleiches gilt auch für die Erhöhung des pH-Wertes auf 8,7 (89 % Wiederfindung) sowie die Verdopplung der PDGF-Konzentration von $2,5$ auf $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (entsprechend 200 bzw. $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit 78 % Wiederfindung.

Neben den Monomeren und Aggregaten wurde im Chromatogramm eine dem Monomerpeak vorangehende Schulter beobachtet, die einem Dimer zugeordnet wurde. Die relativen Anteile der gebildeten Spezies sind in Tab. 4.2 zusammengestellt.

Tab. 4.2: Verteilung der während der Gelfiltration gebildeten Spezies

Bedingungen	Aggregate [%]	Dimer [%]	Monomer [%]	Summe [%]
0,25 mol·l ⁻¹ Gnd-HCl *	1	3	68	72
0,5 mol·l ⁻¹ Gnd-HCl	4	4	83	91
5 mg·ml ⁻¹ PDGF	8	3	78	89
GSH/GSSG 20:1	1	4	83	90
GSH/GSSG 10:1	2	4	85	91
GSH/GSSG 5:1	5	5	82	92

* Der Monomerpeak besteht aus einem symmetrischen Hauptpeak (54 %) und einer ausprägen Schulter (46 %; vgl. Abb. 4.8).

Die ermittelten Zahlenwerte für jede Spezies in Tab. 4.2 sind als qualitative Richtwerte anzusehen, da die Peaks oftmals ineinanderlaufen und somit keine eindeutige Abgrenzung vorgenommen werden kann. Die Summe der Flächenwerte für die Aggregate, Dimere und Monomere ergibt keine vollständige Bilanz für die UV-Absorption. Unter den dargestellten Bedingungen sind ca. 10 % der Fläche nicht als Peaks identifizierbar. Auffallend dabei ist jedoch das geringe Ausmaß an Aggregation von unter 10 %. Eine detailliertere Diskussion zur Aggregation auf der Säule ist aufgrund der vorhandenen Daten nicht möglich (vgl. Abschnitt 4.4). Auch ist dieses Phänomen bisher nur qualitativ beschrieben worden (Werner, 1994; Batas und Chaudhuri, 1996; Chaudhuri et al. 1996; Gauthier und Patston, 1997).

4.2.1.3 Renaturierung verunreinigter PDGF-Einschlußkörper

PDGF ließ sich auch in stark verunreinigtem Zustand renaturieren. Dazu wurden die solubilisierten Einschlußkörper nicht unter denaturierenden Bedingungen vorgereinigt, sondern direkt nach der Solubilisierung für die Renaturierung eingesetzt. Ein Beispielchromatogramm ist in Abb. 4.9 zu sehen. Gezeigt sind die UV-Absorptionsprofile der

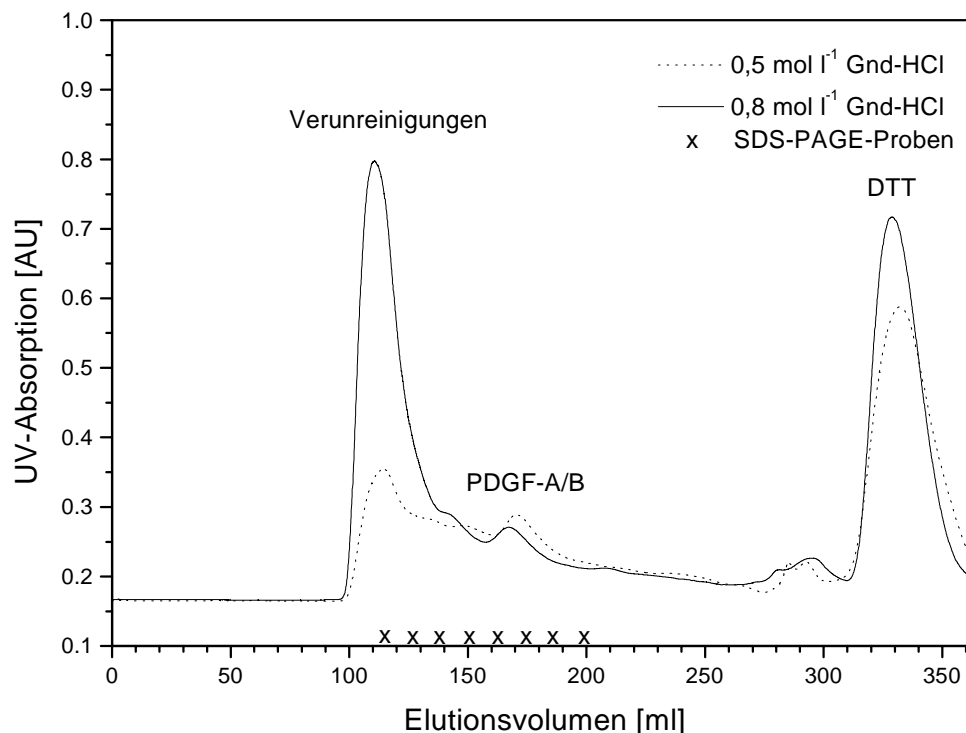


Abb. 4.9: Renaturierung verunreinigter solubilisierter PDGF-A/B-Einschlußkörper in Gegenwart von 0,5 bzw. 0,8 mol·l⁻¹ Gnd-HCl. Gesamtprotein: 8 mg·ml⁻¹, davon 1,2 mg·ml⁻¹ PDGF-A/B; Puffer: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8; 10 mmol·l⁻¹ GSH; 0,25 mmol·l⁻¹ GSSG; T = 25°C; Flußrate: 2 ml·min⁻¹; Beladung: 1 ml.

Renaturierung in Gegenwart von 0,5 bzw. 0,8 mol·l⁻¹ Gnd-HCl. Der Verlauf der UV-Absorption bei 0,8 mol·l⁻¹ Gnd-HCl ist dem bei der denaturierenden Aufreinigung (Abb. 4.1) sehr ähnlich. PDGF eluiert nach den Verunreinigungen. Die Auflösung der Peaks ist allerdings geringer, so daß diese ineinanderlaufen. Abb. 4.10 zeigt die reduzierende SDS-PAGE - Analyse verschiedener Fraktionen. Daraus ist zu ersehen,

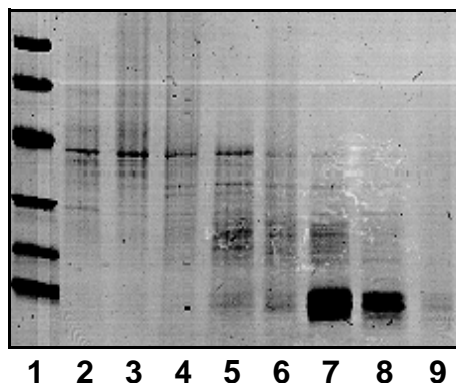


Abb. 4.10: Reduzierende SDS-PAGE - Analyse des Eluats bei der Renaturierung verunreinigter PDGF-A/B-Monomere in Gegenwart von 0,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl. **1** Markerproteine (kDa): 94 (oben); 67; 43; 30; 20,1; 14,4; **2-9** Eluatfraktionen von 114 - 198 ml (vgl. Abb. 4.9): **2** Ve = 114 ml; **3** Ve = 126 ml; **4** Ve = 138 ml; **5** Ve = 150 ml; **6** Ve = 162 ml; **7** Ve = 174 ml; **8** Ve = 186 ml; **9** Ve=198 ml.

← PDGF-A/B - Monomere

daß die PDGF-haltigen Fraktionen zu einem geringen Ausmaß mit Fremdproteinen verunreinigt sind (Spuren 7 und 8). Es konnte keine vermehrte Aggregation während der Chromatographie beobachtet werden (Spuren 2 bis 4). Im Bereich von 150 bis 162 ml wurde ebenfalls PDGF in Form der Monomere nachgewiesen (Spuren 5 und 6), die vermutlich als Dimere von der Chromatographiesäule eluierten. Nach Elution wurde eine Reaktion der PDGF-Monomere zu disulfidverbrückten Dimeren in der nicht reduzierenden SDS-PAGE beobachtet (vgl. Abb. 4.4 bzw. 4.5; Abschnitt 4.2.1).

Während Lage und Form des PDGF-Peaks in Abb. 4.9 bei beiden gewählten Bedingungen nur geringe Unterschiede aufweisen, ist die Absorption der Verunreinigungen bei $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl deutlich niedriger. Ähnlich der Fluoreszenz ist auch die UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren abhängig von deren Umgebung und repräsentiert somit den Faltungszustand des Proteins (Mach et al., 1992; Welfle, 1996). Möglicherweise liegt der gefundene Unterschied hierin begründet.

Es wird somit festgestellt, daß die Renaturierung von PDGF auch ohne vorgeschalteten Reinigungsschritt mittels Gelfiltration effektiv möglich ist. Die kontaminierenden Proteine beeinflussen den Renaturierungsprozeß von PDGF während der Gelfiltration nicht.

4.2.2 Untersuchung der Dimerisierung mittels SDS-PAGE

4.2.2.1 Kinetik der Dimerisierung

Die irreversible Blockierung der für die Dimerisierung essentiellen Thiolgruppen von PDGF mit Iodessigsäure (Abschnitt 3.5) nach Elution von der Gelfiltrationssäule stellt eine gute und einfache Methode dar, die Kinetik der Dimerisierung zu untersuchen.

Die PDGF-enthaltenden Peakfraktionen stellen dabei batch-Ansätze unterschiedlicher Konzentrationen dar, denen als Funktion der Zeit Aliquote entnommen und mit Iodessigsäure versetzt wurden.

In den Abb. 4.4 und 4.5 (Abschnitt 4.2.1) ist der Verlauf der Dimerisierung bereits vorgestellt worden. Es wurde festgestellt, daß diese Reaktion im Stundenbereich abläuft und somit sehr langsam ist.

Zudem wurde zu Beginn der Reaktion eine zweite Bande im Dimerbereich (D^*) gefunden, die in ihrer Intensität sehr schwach ist und nach ca. 5 h unter die Detektionsgrenze fällt bzw. von D überlagert wird. Die Vermutung, es könne sich dabei um das größere AA-Dimer handeln, das schnell gebildet wird, dann jedoch wieder zerfällt und zum thermodynamisch stabileren AB-Dimer rekombiniert, wurde widerlegt. Nach Blotting und N-terminaler Sequenzierung wurden beide Sequenzen PDGF-A und PDGF-B gefunden. Bei der Renaturierung von PDGF-A ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde ebenfalls eine zweite sehr viel schwächere Dimerbande beobachtet, die jedoch nicht identifiziert werden konnte (Richter, 1997). Bei den beobachteten dimeren Spezies größerer molarer Masse könnte es sich möglicherweise um ein Intermediat mit nicht nativen Disulfidbrücken handeln, die ein anderes Verhalten in der Gelelektrophorese zeigen. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung gemischter Disulfide aus Proteinthiolresten und oxidiertem Glutathion, die in einer "kinetischen Falle" festgehalten werden. Das entstandene Molekül besitzt eine andere molare Masse und eine andere Struktur und sorgt dadurch für eine veränderte Mobilität in der SDS-PAGE (Gilbert, 1994). Bei der Renaturierung des dimeren VEGF₁₆₅ (vascular endothelial growth factor) wurden ebenfalls verschiedene Banden im Dimerbereich in der SDS-PAGE beobachtet, die VEGF enthielten (Siemeister et al., 1996). Als Ursache wurde die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität verschiedener gebildeter Intermediate angegeben. Systematische Untersuchungen zur elektrophoretischen Mobilität cysteinhaltiger Proteine nach Behandlung mit Schwefelreagenzien bestätigen prinzipiell die beschriebene Beobachtung (Malhotra und Sahal, 1996).

Weiterhin wurde in einigen Fällen eine ebenfalls schwache diffuse Bande im Bereich eines Trimeren beobachtet, die in ihrer Intensität an der unteren Nachweisgrenze lag und sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht veränderte. Diese Spezies wurde jedoch nicht in die weiteren Betrachtungen einbezogen.

Die densitometrische Bestimmung lieferte die relativen Massenkonzentrationen der jeweiligen Spezies (Abb. 4.5; Abschnitt 4.2.1), die in ihrem zeitlichen Verlauf Sättigungscharakter zeigten. Der konstante Endwert beider Spezies deutet auf eine nicht vollständig ablaufende Reaktion hin. Mögliche Ursachen dieses unvollständigen Umsatzes werden in Abschnitt 4.2.2.6 analysiert.

4.2.2.2 Bestimmung der Reaktionsordnung

Der zeitliche Verlauf der relativen Konzentrationen der Monomere und Dimere in Abb. 4.5 deutet auf einen Reaktionsmechanismus, an dem lediglich eine Teilreaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Komplexe Reaktionsfolgen mit mehreren geschwindigkeitsbestimmenden Teilschritten sind durch einen ausgeprägten sigmoidalen Kurvenverlauf charakterisiert (Jaenicke und Rudolph, 1989; Plomer und Gafni, 1993). Unimolekulare Reaktionen sowie gekoppelte Reaktionen erster Ordnung zeigen häufig ein derartiges Verhalten. Es ist daher bei der Betrachtung der Renaturierung wichtig, die Reaktionsordnung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes festzustellen. Dies geschieht im einfachsten Fall durch Einsetzen der Konzentrationen in die integrierten Geschwindigkeitsgesetze (Abschnitt 2.6.2.1). In Abb. 4.11 ist dies für die Monomerabnahme geschehen. Die linearisierte Auftragung erfolgte dabei unter Annahme einer Reaktion erster sowie zweiter Ordnung. Beide Kurvenverläufe lassen sich damit bis zu einer Reaktionszeit von 6 h gut (Regressionskoeffizient $> 0,99$) beschreiben. Die aus

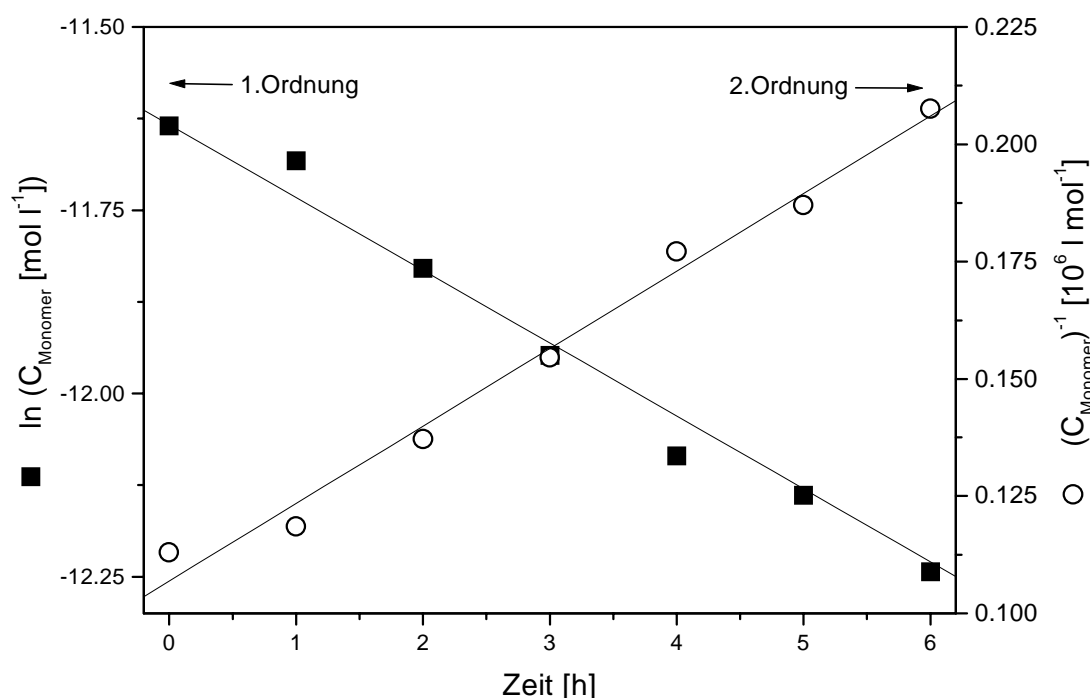


Abb. 4.11: Linearisierte Auftragung der Monomerkonzentrationen unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung (■) und einer Reaktion zweiter Ordnung (○) zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten bei der Dimerisierung von PDGF-A/B. Monomeranfangskonzentration: $110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$

der Steigung der jeweiligen Gerade ermittelte Geschwindigkeitskonstante für eine Reaktion erster Ordnung beträgt $k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und für eine Reaktion zweiter Ordnung $k_2 = 2,5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Eine eindeutige Festlegung auf eine Reaktionsordnung ist mit dieser Methode nicht möglich. Mit Hilfe des zeitlichen Verlaufes der umgesetzten Monomere (Abschnitt 2.6.2.2) läßt sich die Reaktionsordnung ebenfalls bestimmen. Ist der Umsatz unabhängig von der Monomerkonzentration, so liegt eine Reaktionsordnung von eins vor, besteht eine Abhängigkeit, so resultiert eine höhere Ordnung. Abb. 4.12 zeigt den

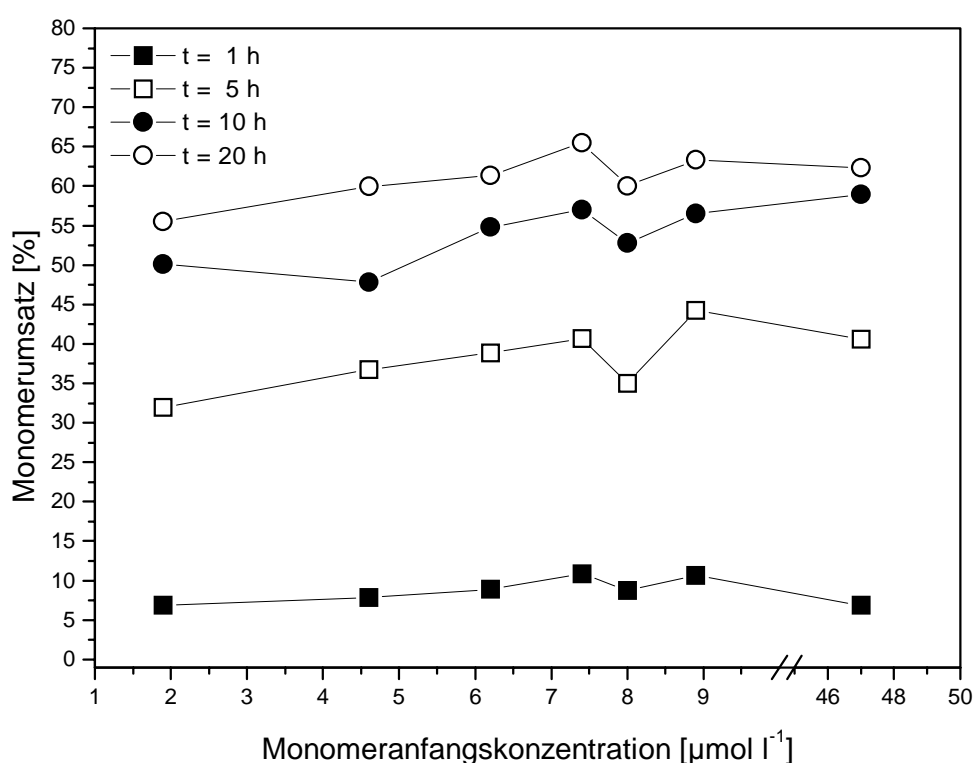


Abb. 4.12: Bestimmung der Reaktionsordnung mit der Umsatzmethode. Konstanz des Monomerumsatzes als Funktion der Monomeranfangskonzentration zu verschiedenen Reaktionszeiten. Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$.

ermittelten Monomerumsatz als Funktion der Monomeranfangskonzentration für unterschiedliche Dimerisierungszeiten. Die Monomeranfangskonzentrationen wurden dabei durch N-terminale Sequenzierung erhalten. Über einen Konzentrationsbereich von $1,9$ bis $47 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (entsprechend 24 bis $584 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) ist der Umsatz im betrachteten Zeitraum konstant. Diese Unabhängigkeit des Umsatzes zeigt eindeutig, daß diese Reaktion erster Ordnung ist. Die Ermittlung der Reaktionsordnung nach der Differential-

methode (Abschnitt 2.6.2.3) ergab einen Wert von 0,99 (siehe Anhang, Abschnitt 7.2). Nach Schwetlick et al. (1989) ist dieses Verfahren sehr zuverlässig. Auch niedrigere Konzentrationen ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bei der Dimerisierung von PDGF-A nach dem gleichen Verfahren lieferte eine Reaktionsordnung von 1 (Richter, 1997). Jaumann et al. (1991) untersuchten die Dimerisierung von rekombinanten PDGF-A - Mutanten, bei denen jeweils einer der für die biologische Aktivität nicht essentiellen Cysteinreste durch Serin ersetzt wurde. Dabei wurde eine deutlich höhere Assoziationsgeschwindigkeit gefunden, wenn statt entfalteter vorgefaltete Monomere eingesetzt wurden. Auch diese Beobachtung ist konsistent mit einer Reaktionsordnung von eins.

Die graphische Ermittlung der Halbwertszeit der Dimerisierung im Konzentrationsbereich von $1,9$ bis $47 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergab einen mittleren Wert von $3,8 \text{ h} \pm 0,4 \text{ h}$ und weist somit ebenfalls aufgrund der Unabhängigkeit von der Konzentration auf eine Reaktion erster Ordnung hin.

Für noch niedrigere Konzentrationen wurde von verschiedenen Autoren eine Änderung der Reaktionsordnung festgestellt. Diese Beobachtung wurde mit einem weiteren zusätzlich limitierenden Reaktionsschritt (Assoziation) interpretiert. Price (1994) beschreibt bei der Renaturierung der dimeren Triosephosphat-Isomerase die Existenz einer Schwellenkonzentration von $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, oberhalb derer die Reaktion erster Ordnung und unterhalb derer die Reaktion zweiter Ordnung gehorcht. In einem Übergangsbereich bestimmen Reaktionen beider Ordnungen die Geschwindigkeit. Plomer und Gafni (1993) dokumentierten an der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase einen Wechsel der Reaktionsordnung von eins nach zwei bei Konzentrationen von $< 32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($= 0,59 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ziegler et al. (1993) beschrieben an der Luciferase aus *E. coli* eine Schwellenkonzentration von $10 - 20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($= 0,26 - 0,52 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Für eine Assoziationsreaktion müssen die Reaktionspartner zusammenstoßen. Die Reaktion selbst ist hochspezifisch und verläuft in vielen Fällen sehr schnell (10^4 bis $10^6 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; Price, 1994), so daß der Transport der Teilchen zueinander hin bei niedrigeren Konzentrationen die limitierende Größe darstellt und somit der Prozeß der Assoziation zum geschwindigkeitsbestimmenden Teilschritt wird.

Mit Hilfe der experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten unter Annahme einer Reaktion erster bzw. zweiter Ordnung wurden die zeitlichen Verläufe des Umsatzes der Renaturierung von PDGF-A/B simuliert. Abb. 4.13 stellt die Ergebnisse dar. Dabei lassen sich die experimentellen Daten unter Annahme einer Reaktion erster

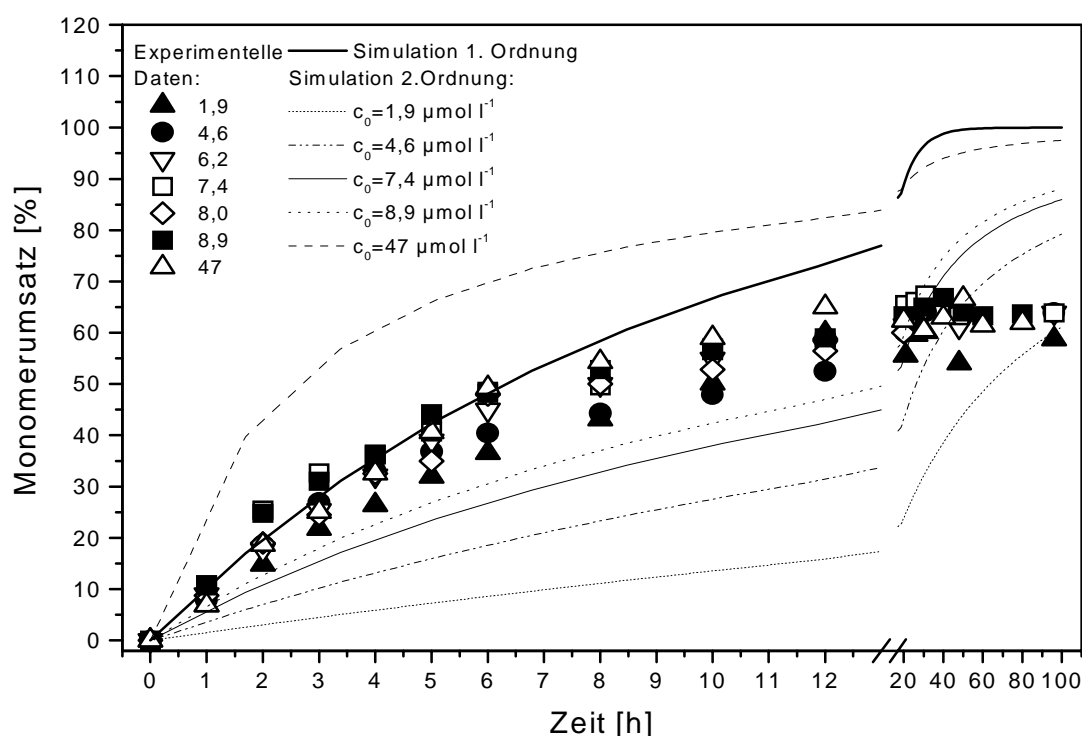


Abb. 4.13: Experimentell ermittelter und simulierter zeitlicher Verlauf des Monomerumsatzes als Funktion der Monomeranfangskonzentration bei der Dimerisierung von PDGF-A/B. Simulationen unter Annahme einer Reaktion 1. sowie 2. Ordnung mit $k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_2 = 2,5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$.

Ordnung ($k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) bis zu einer Reaktionszeit von 6 h gut beschreiben. Der Kurvenverlauf des experimentellen Umsatzes zeigt zu längeren Reaktionszeiten größer werdende Abweichungen zu den simulierten Kurven. Der unvollständige Umsatz kann somit nicht erklärt werden. Die simulierten Kurvenverläufe für eine Reaktion zweiter Ordnung ($k_2 = 2,5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) weisen keine Übereinstimmung mit den experimentellen Daten auf. Dieser Sachverhalt bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse, daß die geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion der Renaturierung von PDGF einer Reaktionsordnung von 1 gehorcht.

4.2.2.3 PDGF-Isoformen

Verschiedene Untersuchungen zur Renaturierung von PDGF aus Einschlusskörpern von *E. coli* (Hoppe et al., 1990) bzw. zur Expression in CHO-Zellen (Östman et al., 1988) zeigten eine bevorzugte Bildung des Heterodimers PDGF-AB. Letztgenannte

Autoren quantifizierten die jeweiligen Anteile der Isoformen zu 1,58:5,75:1 (19 % AA, 69 % AB, 12 % BB). Für ein 1:1 - Gemisch statistisch zu erwarten wäre eine 1:2:1 - Verteilung (25 % AA, 50 % AB, 25 % BB) der Isoformen. Hammacher et al. (1988) fanden neben dem die Hauptmenge ausmachenden Heterodimer zusätzlich PDGF-BB zu etwa 30 % in den α -Granula der Thrombozyten. Hart et al. (1990) isolierten aus frisch präparierten Blutplättchen auch PDGF-AA zu etwa 27 %. McCarthy und Schneppe (1993) folgerten aus diesen Befunden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, eine statistische Verteilung der Isoformen vorliege und der Anteil der beiden Homodimere dem des Heterodimers entspricht (s.o.). Soma et al. (1992) dokumentierten für menschliche Blutplättchen einen etwa achtfachen Überschuß der PDGF-A - Kette gegenüber der B-Kette. Mit der Annahme, daß die gesamte Menge an B-Monomeren in der AB-Isoform zu finden ist, resultiert ein PDGF-AA - Anteil von 75 % gegenüber 25 % PDGF-AB. Dieser Befund widerspricht der Beobachtung der genannten anderen Autoren. Systematische Untersuchungen zur Verteilung der Isoformen und deren Ursachen wurden bisher nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Renaturierungskinetik für alle drei möglichen Isoformen bestimmt. Es zeigte sich, daß die Heterodimerbildung mit $k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ unter Annahme einer irreversiblen Reaktion erster Ordnung etwa dreimal schneller verläuft als die Homodimerbildung mit $k_1 = 0,5 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Die AA-Dimerbildung unterscheidet sich dabei von der BB-Dimerbildung nicht. Die kinetischen Daten sind in Tab. 4.3 (Abschnitt 4.2.2.4.1) zusammengefaßt. Abb. 4.14 veranschaulicht die gefundenen Unterschiede der Dimerisierung der drei PDGF-Isoformen. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe des Monomerumsatzes bei 35°C.

Die PDGF-A/B - Monomere werden während der ersten 2,5 h zu ca. 40 % umgesetzt, die Monomere A und B dagegen nur zu etwa 15 %. Die Heterodimerisierung konnte somit als die kinetisch günstigere Reaktion identifiziert werden, wobei die Produktverteilung zu 1:6:1 (12,5 % AA, 75 % AB, 12,5 % BB) berechnet wurde. Diese Zahlenwerte liegen sehr nah an den von Östman et al. veröffentlichten Daten und bestätigen die über das statistische Ausmaß begünstigte Heterodimerbildung. Zudem konnte gezeigt werden, daß dieser Sachverhalt durch kinetische Ursachen begründet ist.

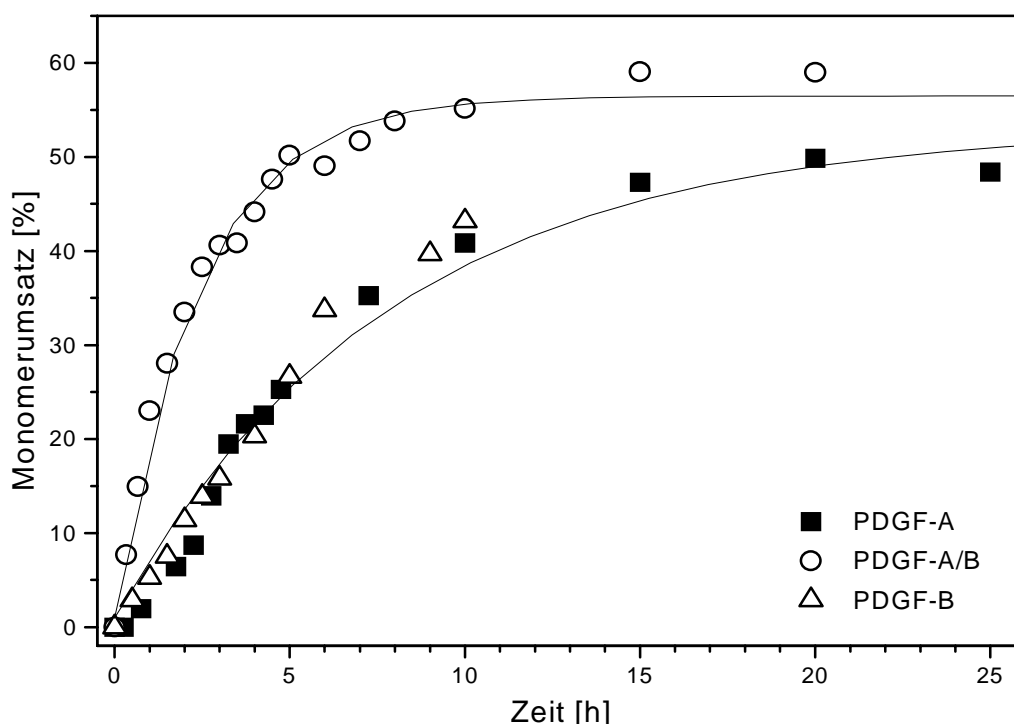


Abb. 4.14: Zeitlicher Verlauf des Monomerumsatzes bei der Dimerisierung von PDGF-A, -A/B und -B. Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; PDGF-A: $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($0,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); PDGF-A/B: $115 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($9,25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); PDGF-B: $43 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($3,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); $T = 35^\circ\text{C}$; Flußrate: $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Probenauftrag: 1 ml .

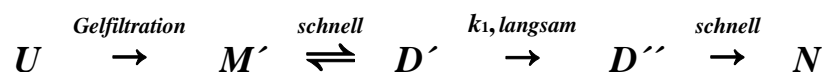
Die Beobachtung, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Renaturierung von PDGF einer Reaktionsordnung von 1 gehorcht, wirft die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt des Renaturierungsprozesses diese limitierende Teilreaktion stattfindet.

Zum einen könnte es sich um eine Faltungsreaktion auf der Stufe der Monomere handeln. Die Gelfiltration liefert monomere Faltungsintermediate, die nachfolgend in eine assoziationskompetente Konformation überführt werden. Mit der schnellen Bildung der intermolekularen Disulfidbrücken wird die Renaturierung dann abgeschlossen.

Zum anderen könnte dieser Schritt auch auf der Stufe der bereits assoziierten, aber noch nicht kovalent verbundenen Monomere auftreten. Diese limitierenden Konformationsänderungen ermöglichen dann die intermolekularen Disulfidverbrückungen.

Die kinetische Betrachtung der drei Isoformen deutet auf den letztgenannten Mechanismus hin. Wäre eine Konformationsänderung auf der Monomerebene die geschwindigkeitslimitierende Reaktion, so ergäbe die separate Faltung der Monomere bei der Heterodimerbildung keine Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten.

Die bisher beschriebenen experimentellen Ergebnisse lassen sich somit mit folgendem Reaktionsschema interpretieren:



Schema 6: Möglicher Renaturierungsmechanismus von PDGF

Die vollständig entfalteten und reduzierten Polypeptidketten (U) werden durch die Gelfiltration in monomere Faltungsintermediate (M') überführt, die schnell nicht kovalent assoziieren (D'). Auf dieser Stufe finden die zur Bildung der Disulfidbrücken notwendigen Konformationsänderungen zu D'' statt, von wo aus schnell das native Protein N entsteht.

4.2.2.4 Einflußgrößen

Die systematische Änderung der Renaturierungsparameter liefert weitere Aussagen über Abhängigkeiten des Umsatzes oder der Geschwindigkeitskonstanten, die wiederum Aufschluß über den möglichen Mechanismus des Gesamtprozesses geben können. Im folgenden werden Variationen der Temperatur, der Gnd-HCl - Konzentration sowie der Redoxbedingungen beschrieben.

4.2.2.4.1 Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur ist ein wichtiger Parameter für den Renaturierungsprozeß. Ausmaß und Geschwindigkeit von Nebenreaktionen werden entscheidend durch die Temperatur bestimmt. Zusätzlich läßt sich die Aktivierungsenergie des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes ermitteln, die im Falle der verschiedenen PDGF-Isoformen weiteren Aufschluß über die beobachtete bevorzugte Bildung des Heterodimers geben könnte. Die Renaturierung wurde im Temperaturbereich von 4°C bis 45°C untersucht. Tabelle 4.3 faßt die Ergebnisse für die drei PDGF-Isoformen zusammen.

Tab. 4.3: Temperaturabhängigkeit der Dimerisierung von PDGF

Temperatur [°C]	Geschwindigkeitskonstante k_i [10 ⁻⁵ s ⁻¹]			Ausbeute [%]		
	PDGF-A*	PDGF-AB	PDGF-B*	PDGF-A	PDGF-AB	PDGF-B
4	0,03 ± 0,005	0,06 ± 0,015	0,05 ± 0,005	18	17	17
15	0,13 ± 0,005	0,5 ± 0,1	0,17 ± 0,01	25	55	45
25	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,05	50	61	50
35	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,0 ± 0,05	50	59	51
45	1,0 ± 0,05	2,0 ± 0,15	0,5 ± 0,05	50	57	47

* Berechnung aus Meßergebnissen von Richter (1997)

Über den gesamten untersuchten Temperaturbereich verläuft die Renaturierung des Heterodimers signifikant schneller als die der beiden Homodimere. Zwischen 15°C und 35°C ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion um den Faktor 3 größer. Bis 35°C ist eine deutliche Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten und der Ausbeute zu beobachten, während bei 45°C eine Abnahme bzw. Stagnation festzustellen ist (siehe auch Abb. 4.15). Dies korreliert mit der Beobachtung einer Trübung des Reaktionsansatzes, die auf Aggregation hindeutet. Die aggregierten Faltungsintermediate sind dem Reaktionsansatz irreversibel entzogen. Möglicherweise ist die Tertiärstruktur der Intermediate bei diesen Bedingungen weniger stabil, so daß die Assoziation erschwert ist bzw. auch ein höheres Maß an Dissoziation stattfindet.

Die Ermittlung der Aktivierungsenergie für die Reaktion erfolgte nach dem Ansatz von Arrhenius für die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante:

$$k = F \cdot e^{\left(-\frac{E_A}{R \cdot T}\right)} \quad (4.1)$$

mit	k	Geschwindigkeitskonstante	[s ⁻¹]
	F	präexponentieller Faktor	[s ⁻¹]
	E _A	Aktivierungsenergie	[J·mol ⁻¹]
	R	allgemeine Gaskonstante	[J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
	T	absolute Temperatur	[K]

Die logarithmierte Form von Gl. 4.1 liefert einen linearen Zusammenhang zwischen der reziproken Temperatur und dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante:

$$\ln k = \ln F - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4.2)$$

Aus der Steigung der resultierenden Geraden lässt sich die Aktivierungsenergie berechnen. Mit Hilfe der Abb. 4.15 ist dies geschehen. Die Kurvenverläufe verdeutlichen noch einmal die Unterschiede zwischen den Isoformen. Das abweichende Verhalten der Zahlenwerte für k_1 bei 45°C lässt auf die Beteiligung weiterer Reaktionen am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt schließen. Die beobachtete Trübung im Reaktionsansatz deutet auf Aggregation (s.o.). In die Berechnung der Aktivierungsparameter einbezogen wurden daher nur die Werte für 4°C bis 35°C. In Tab. 4.4 sind die Aktivierungsenergien zusammengestellt.

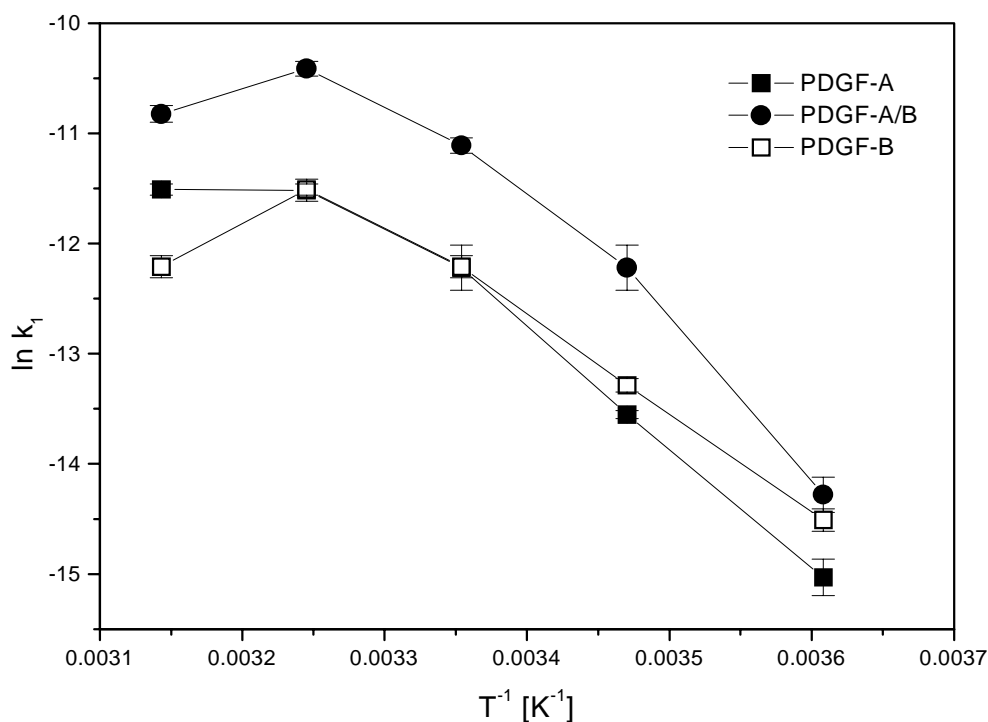


Abb. 4.15: Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 bei der Dimerisierung der verschiedenen PDGF-Isoformen. PDGF-A: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); PDGF-A/B: $115 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($9,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); PDGF-B: $43 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG.

Tab. 4.4: Aktivierungsenergien und präexponentielle Faktoren

PDGF-Isoform	Aktivierungsenergie E_A [kJ·mol ⁻¹]	Präexponentieller Faktor F [s ⁻¹]
PDGF-AA	78 ± 4	3·10 ⁶
PDGF-AB	82 ± 13	2·10 ⁹
PDGF-BB	68 ± 3	2·10 ⁸

Die Aktivierungsenergien für die Dimerisierungsreaktion liegen im Bereich von 70 bis 80 kJ·mol⁻¹. Dabei unterscheiden sich die drei Isoformen nicht wesentlich, wenn man die Meßgenauigkeit einbezieht. Die bevorzugte Heterodimerbildung kann aus diesem Ergebnis nicht abgeleitet werden.

4.2.2.4.2 Gnd-HCl

Ein weiterer Parameter, der die Renaturierung von Proteinen stark beeinflusst, ist der Zusatz denaturierender Verbindungen. Die Dimerisierung von PDGF wurde bei unterschiedlichen Gnd-HCl - Konzentrationen (0 bis 1,5 mol·l⁻¹) verfolgt. In Abb. 4.16 ist der zeitliche Verlauf des Monomerumsatzes gezeigt. Mit zunehmender Gnd-HCl - Konzentration im Renaturierungspuffer nimmt der Umsatz der Monomere von ca. 90 % bei 0 mol·l⁻¹ Gnd-HCl auf ca. 12 % bei 1,5 mol·l⁻¹ stark ab. Der Zusatz von 2 mol·l⁻¹ Gnd-HCl (Aufreinigungsbedingungen, Abschnitt 4.1) lieferte auch nach mehrwöchiger Lagerung bei 4°C keine Dimere. Diese Bedingungen verhindern eine Dimerisierung vollständig. Die intermolekularen Kontakte sind offensichtlich immer weniger erfolgreich für eine Dimerisierung mit zunehmenden Gnd-HCl - Konzentrationen. Diese Beobachtung stimmt mit der Eigenschaft des Guanidiniums überein, das dreidimensionale Kräftegefüge in Proteinen derart zu stören, daß eine Denaturierung erfolgt bzw. umgekehrt die Faltung zur aktiven Spezies nicht vollständig stattfinden kann. Mechanistische Betrachtungen zur denaturierenden Wirkung von Gnd-HCl bzw. Harnstoff zeigen zwei Effekte. Zum einen wird das geordnete Wasserstoffbrücken-Netzwerk gegenüber reinem Wasser gestört, so daß die Wassermoleküle auch intensiv

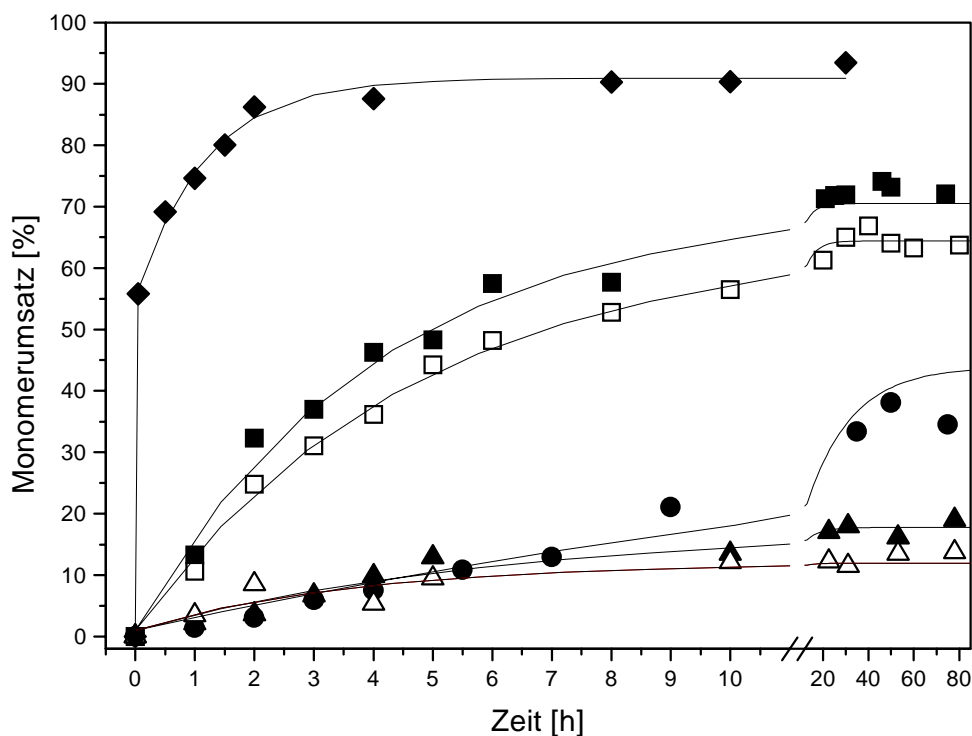


Abb. 4.16: Zeitlicher Verlauf des Monomerumsatzes bei der Dimerisierung von PDGF als Funktion der Gnd-HCl-Konzentration; (♦) ohne Gnd-HCl; PDGF-A; (■) 0,25 mol·l⁻¹; (□) 0,5 mol·l⁻¹; (●) 0,8 mol·l⁻¹; (▲) 1,2 mol·l⁻¹ und (Δ) 1,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl. Puffer: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8; 10 mmol·l⁻¹ GSH; 0,25 mmol·l⁻¹ GSSG; T = 25°C.

mit den Proteinmolekülen wechselwirken (chaotrope Wirkung; Schiffer und Dötsch, 1996). Andererseits ist die Affinität der verschiedenen Aminosäuren zu den denaturierenden Agenzien selbst unterschiedlich stark ausgeprägt, wobei besonders die aromatischen und hydrophoben Aminosäuren bevorzugt mit diesen wechselwirken (Prakash et al., 1981, Dötsch et al., 1995, Schiffer und Dötsch, 1996).

Auch die Geschwindigkeitskonstanten zeigen eine starke Abhängigkeit von der Gnd-HCl - Konzentration. Während in Abwesenheit des chaotropen Salzes die Monomere schon nach 1 h zu 70% umgesetzt sind, wird in Gegenwart von 1,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl lediglich ein Umsatz von 4 % erzielt. Abb. 4.17 verdeutlicht diesen Befund. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung sind als Funktion der Gnd-HCl-Konzentration aufgetragen. Dabei unterscheiden sich die höchste Geschwindigkeitskonstante ($k_1 = 7,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; ohne Gnd-HCl; PDGF-A) und die niedrigste ($k_1 = 2,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; 1,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl) um den Faktor 37.

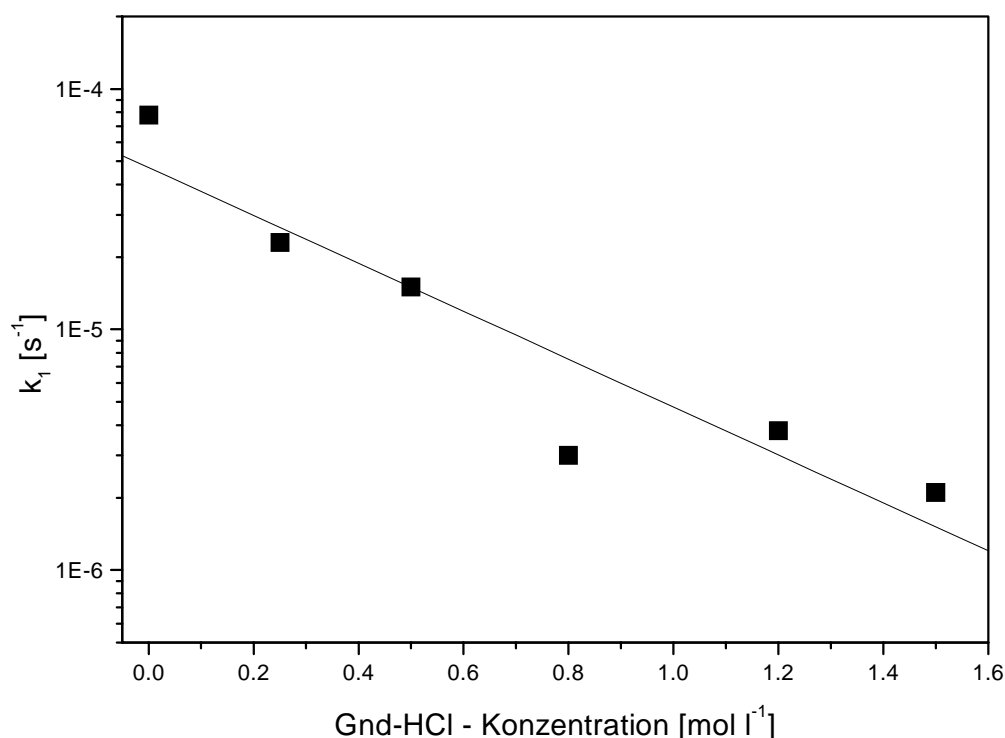


Abb. 4.17: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 von der Gnd-HCl-Konzentration. Renaturierungsparameter wie bei Abb. 4.16.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung von Gnd-HCl auf die Renaturierung von PDGF zeigen zwei gegenläufige Effekte. Je geringer die Konzentration an Gnd-HCl gewählt wird, desto höher ist der Umsatz der Monomere sowie die Geschwindigkeit der Reaktion. In dieser Richtung nimmt jedoch auch das Ausmaß an Aggregation während der Gelfiltration zu (Abschnitt 4.2.1.2). Für eine Optimierung der Ausbeute an Dimeren ist somit ein Kompromiß zu wählen. Dabei läßt das zweistufige Verfahren eine selektive Optimierung der Bedingungen jeder Stufe zu.

4.2.2.4.3 Redoxbedingungen

Der Zusatz eines Redoxsystems (z.B. oxidiertes und reduziertes Glutathion) ist für eine effektive Bildung von Disulfidbrücken notwendig. Rudolph und Fuchs (1983) zeigten, daß bezüglich der Renaturierungsausbeute ein vom jeweiligen Protein abhängiges optimales Verhältnis der beiden Komponenten zueinander existiert. Dieses wurde in

vielen Fällen zu 10:1 (GSH:GSSG) gefunden. Die Autoren zeigten an der Ribonuclease A, daß steigende GSSG-Konzentrationen eine Verkürzung der Halbwertszeit der Renaturierung bewirken ($t_{1/2} = 80$ h bei $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG gegenüber $t_{1/2} = 10$ h bei $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG). Physiologische Redoxbedingungen ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH und $0,01$ - $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG) lieferten hohe Renaturierungsausbeuten, während sie bei weiter steigender GSSG-Konzentration bis auf 0 % zurückgingen. Wird eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der GSSG-Konzentration gefunden, deutet dies auf eine Disulfidbrückenbildung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Renaturierung. Tannhauser et al. (1997) identifizierten bei der Renaturierung der rekombinanten Hirudin-Variante 1 eine solche Reaktion als limitierend. Dabei wurde Dithiothreitol in der oxidierten Form als Redoxreagenz zugegeben. Im Verlauf der Reaktion der Proteinthiole mit oxidiertem Dithiothreitol entstand reduziertes Dithiothreitol. Beide Formen bildeten somit das Redoxsystem. Vergleichbare Ergebnisse wurden jedoch auch mit Glutathion erhalten (Chatrenet und Chang, 1993).

Die Renaturierung von PDGF wurde für einen Bereich von $0,25$ bis $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG durchgeführt. In Tab. 4.5 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 4.5: Variation der Redoxbedingungen *

GSH [mmol·l ⁻¹]	GSSG [mmol·l ⁻¹]	GSH:GSSG	Geschwindigkeitskonstante k_1 [10 ⁻⁵ s ⁻¹]	Monomerumsatz [%]
10	0,25	40:1	$1,5 \pm 0,1$	64
5	0,25	20:1	$1,5 \pm 0,1$	62
5	0,5	10:1	$1,6 \pm 0,06$	89
5	1,0	5:1	$0,7 \pm 0,13$	57

* T=25°C; pH=7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; PDGF-AB: $92 - 110 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($7,4 - 8,9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Die Geschwindigkeitskonstanten und der Umsatz der Monomere für die Redoxverhältnisse 40:1 und 20:1 unterscheiden sich nicht. Im angegebenen Konzentrationsbereich nimmt der GSH-Anteil keinen beobachtbaren Einfluß auf die Renaturierung. Die Erhöhung der GSSG-Konzentration auf $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bewirkt ebenfalls keine Veränderung der Geschwindigkeitskonstante, jedoch eine deutliche Erhöhung des Monomerumsatzes auf 89 %. Abb. 4.18 zeigt den zeitlichen Verlauf des Monomerumsatzes für die unterschiedlichen Redoxbedingungen. Der Kurvenverlauf für eine

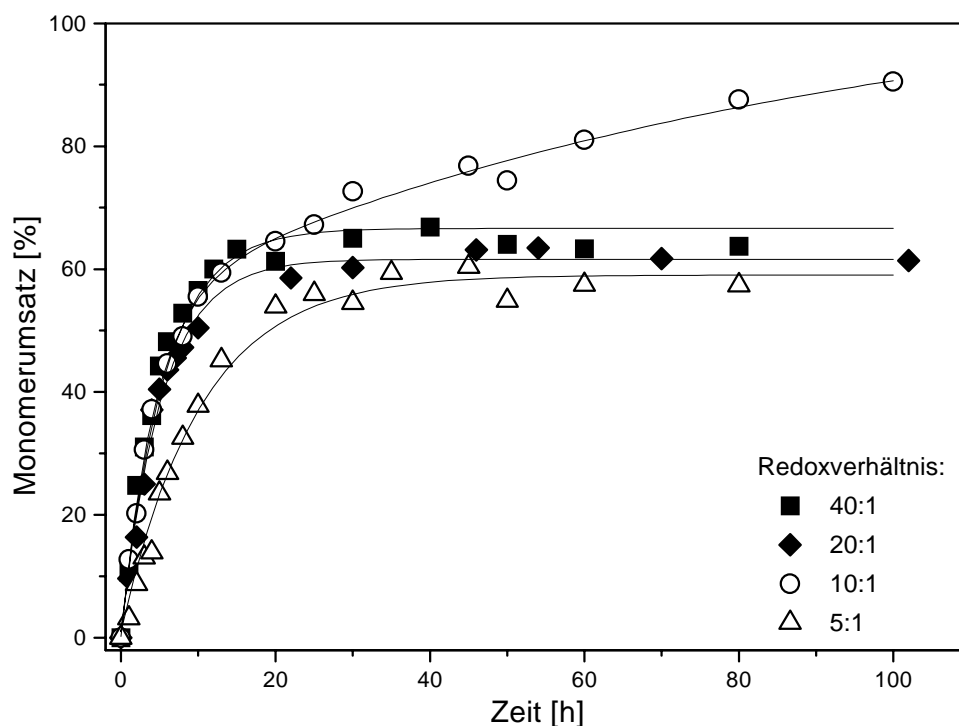


Abb. 4.18: Zeitlicher Verlauf des Monomerumsatzes bei der Dimerisierung von PDGF-A/B als Funktion der Redoxbedingungen (s. Tab. 4.5). PDGF-A/B: $92 - 110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($7,4 - 8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $T = 25^\circ\text{C}$.

GSSG-Konzentration von $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ deckt sich bis zu einer Reaktionszeit von etwa 20 h mit denen der anderen angegebenen Bedingungen. Daran anschließend wurde eine weiterer Umsatzanstieg auf 89 % nach 100 h beobachtet, während die anderen Kurvenverläufe ein Plateau erreichen. Es ist somit davon auszugehen, daß die intermolekulare Disulfidbrückenbildung unter den genannten Bedingungen nicht geschwindigkeitsbestimmend für den Gesamtprozeß der Renaturierung ist. Als Ursache für den erhöhten Monomerumsatz bei diesem Redoxverhältnis von 10:1 (Tab. 4.5 bzw. Abb. 4.18) kommt möglicherweise eine sehr effektiv ablaufende Thiolreaktion sowohl auf der Ebene der Monomere als auch der assoziierten Dimere in Betracht. Verschiedene Autoren erreichten bei diesem Redoxverhältnis maximale Ausbeuten (z.B. Rudolph und Fuchs, 1983; Buchner und Rudolph, 1991).

Bei weiterer Erhöhung der GSSG-Konzentration auf $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde eine Halbierung der Geschwindigkeitskonstante auf $0,7\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ beobachtet, während der Umsatz gegenüber den anderen nur geringfügig niedriger ausfällt. Dieser Befund korreliert mit

den bereits beschriebenen Ergebnissen von Rudolph und Fuchs (1983). Als Ursache wird eine kinetische Konkurrenz zwischen der Faltungsreaktion und der Thiolreaktion angegeben. Letztere Reaktion ist abhängig von der Konzentration der Proteinthiole und der von GSSG. Eine andere Erklärung geht von der Bildung gemischter Disulfide oder nicht nativer Disulfide aus, die die Moleküle in einer kinetischen Falle verharren lassen, so daß die Reaktion langsamer wird und möglicherweise Aggregation auftreten kann (Zettlmeissl et al., 1982).

4.2.2.5 Natur des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes

Mit Hilfe der vorangegangenen Untersuchungen zur Abhängigkeit der Dimerisierung von den Umgebungsparametern lassen sich nun Überlegungen zur Natur des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes anstellen.

Die Aktivierungsenergien der drei PDGF-Isoformen wurden zu 70 - 80 kJ·mol⁻¹ bestimmt. Ein Zahlenwert von etwa 50 kJ·mol⁻¹ wurde für die Bildung einer Disulfidbrücke aus einem typischen Proteinthiol und Glutathion berechnet (Creighton, 1992). Mit der Annahme, daß es sich bei der in der SDS-PAGE beobachteten PDGF-Spezies um das native, zweifach disulfidverbrückte Molekül handelt und die berechnete Aktivierungsenergie diese beiden Verbrückungen widerspiegelt, stimmen diese Zahlenwerte in ihrer Größenordnung gut überein. Möglicherweise ist die Ausbildung der zweiten Disulfidbrücke einfacher, wenn die erste bereits vorhanden ist. Die Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_1 von der GSSG-Konzentration im Bereich 0,25 bis 0,5 mmol·l⁻¹ deutet daraufhin, daß die intermolekulare Disulfidbrückenbildung nicht am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Renaturierung von PDGF beteiligt ist.

Etwa 80 kJ·mol⁻¹ werden auch für die cis-trans-Isomerisierung eines Prolinrestes benötigt (Schmid, 1992). Prolin nimmt aufgrund des Ringschlusses zwischen dem C_α-Atom und dem N-Atom des Peptidgrundgerüsts eine Sonderstellung unter den Aminosäuren ein, so daß weitreichende Konsequenzen für die dreidimensionale Struktur und damit auch die Proteinfaltung resultieren (MacArthur und Thornton, 1991; Thornton, 1992). Die freie Drehbarkeit der C-N-Peptidbindung ist wegen des partiellen Doppelbindungscharakters stark eingeschränkt, so daß die beiden möglichen cis- und trans-Isomere durch eine Energiebarriere voneinander getrennte Spezies darstellen.

Weiterhin besitzt das N-Atom der Peptidbindung keinen Amidwasserstoff zur Wasserstoffbrückenbildung, und schließlich sind auch sterische Effekte des Ringsystems zu berücksichtigen. Etwa 6,5 % aller bekannten X-Pro-Bindungen sind cis-konfiguriert. Ist für die Renaturierung eines Proteins eine Prolinisomerisierung notwendig, so kann dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend für den Gesamtprozeß sein (Zeitkonstante 10 - 420 s bei $T = 25^{\circ}\text{C}$; Zettlmeissl et al., 1982; Schmid, 1992). PDGF besitzt in der A-Kette 8 und in der B-Kette 6 Prolinreste. Die Kristallstruktur der B-Kette zeigt einen cis-konfigurierten Prolinrest an der Position 41 (Abb. 4.19). Dieser

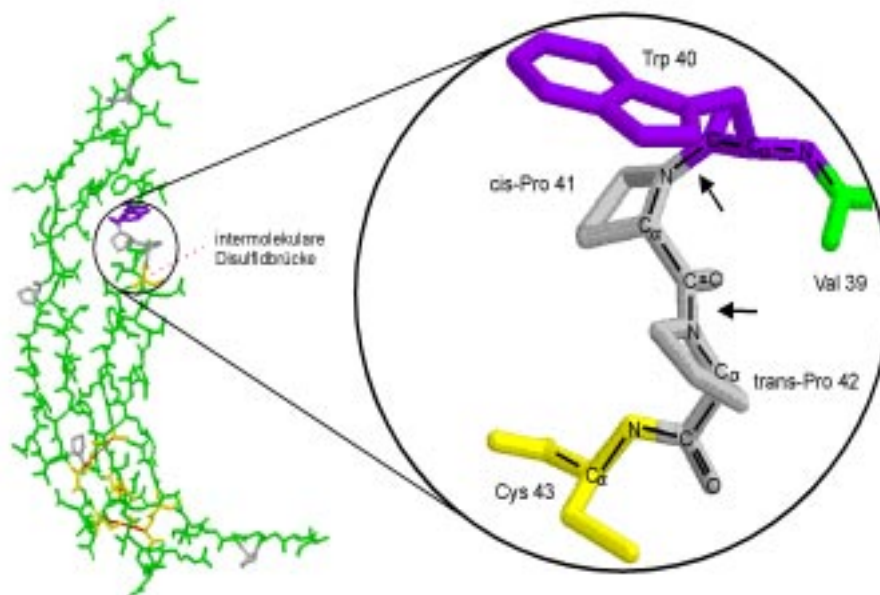


Abb. 4.19: Lage und Konformation der Prolinreste (grau) in PDGF-B. **Links:** PDGF-B-Monomer, **rechts:** Vergrößerter Ausschnitt der Teilsequenz Val39-Trp40-Pro41-Pro42-Cys43 zur Veranschaulichung der cis-Konfiguration von Pro41. Die Pfeile zeigen die zur Beurteilung der Konfiguration wichtigen Peptidbindungen.

ist in die Sequenz Trp40-Pro41-Pro42-Cys43 eingebettet, die auch in der A-Kette vorhanden ist (Trp34-Pro35-Pro36-Cys37). Die Kristallstruktur der A-Kette ist jedoch nicht bekannt. Der Cysteinrest Cys43 in der B-Kette bildet eine intermolekulare Disulfidbrücke aus (ebenso Cys37 in der A-Kette). Möglicherweise spielt die Konformation des nahegelegenen Prolinrestes Pro41 eine wesentliche Rolle für die Thiolreaktion. Mit der Annahme, daß beide PDGF-Ketten die gleiche Konformation in dieser Teilsequenz besitzen, ist somit an zwei verschiedenen Positionen eine

Prolinisomerisierung für die Dimerisierung notwendig. Dafür wäre insgesamt eine Aktivierungsenergie von ca. $160 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ aufzubringen. Dieser Wert liegt jedoch um den Faktor zwei höher als die aus der Arrhenius-Auftragung berechneten Zahlenwerte (Abschnitt 4.2.2.4.1). Bei Abwesenheit eines cis-Prolins in der A-Kette dagegen müßten sich die Aktivierungsenergien der Dimerisierung für die drei Isoformen deutlich unterscheiden.

Eine starke Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Gnd-HCl-Konzentration, wie sie für PDGF gefunden wurde (Abschnitt 4.2.2.4.2), läßt eher auf allgemeine Konformationsänderungen schließen als auf eine Prolinisomerisierung (Kim und Baldwin, 1982). Zudem kann aufgrund sterischer Spannung in einer dem nativen Zustand sehr ähnlichen Konformation die cis-trans - Isomerisierung des Prolinrestes 20 bis 40fach schneller erfolgen als im entfalteten Zustand (Kim und Baldwin, 1982), so daß diese Reaktion nicht notwendigerweise den geschwindigkeitsbestimmenden Teilschritt darstellt.

Der Zusatz des Enzyms Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPI) müßte die Reaktionsgeschwindigkeit stark erhöhen, falls eine cis-trans-Isomerisierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Eine solche Untersuchung wurde jedoch nicht durchgeführt. Allerdings ist die Möglichkeit zur Katalyse dieses Schrittes auch stark an die sterische Erreichbarkeit des Prolinrestes gebunden (Frech und Schmid, 1995).

Aus diesen Betrachtungen wird gefolgert, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dimerisierung von PDGF auf allgemeine Konformationsänderungen zurückgeführt werden kann, die Voraussetzung für die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücken sind.

4.2.2.6 Nebenreaktionen

Die bisherigen Betrachtungen zur Dimerisierung von PDGF zielten im wesentlichen auf die Feststellung der Reaktionsordnung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes und dem Verhalten des Monomerumsatzes sowie der Geschwindigkeitskonstanten gegenüber der Variation verschiedener Umgebungsparameter. Der beobachtete unvollständige Umsatz der Monomere blieb dabei unberücksichtigt. In diesem Kapitel werden deshalb mögliche Ursachen dafür diskutiert und die experimentellen Daten mit Hilfe geeigneter kinetischer Modelle interpretiert. Exemplarisch wird hierzu die Dimerisierung von PDGF-A/B mit einer Konzentration von $8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($T=25^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,8$, $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH, $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG) herangezogen wie sie in Abb. 4.5 (Abschnitt 4.2.1) dargestellt ist.

4.2.2.6.1 Gleichgewichtseinstellung

Zunächst wurde die Möglichkeit einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Monomer und Dimer untersucht. Die zeitlichen Verläufe der relativen Konzentrationen wurden dazu mit Gl. 2.15 angepaßt. Mit $k_1 = 1,5\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($\sum v_a = 2$) als Initialisierungsparameter wurde die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion k_{-1} zu $1,5\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($\sum v_a = 1$) berechnet. Die zeitlichen Verläufe beider Spezies lassen sich damit gut beschreiben. Zur experimentellen Überprüfung der Gleichgewichtshypothese wurde natives PDGF-AB - Dimer erneut den Renaturierungsbedingungen ausgesetzt (Zusatz von $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

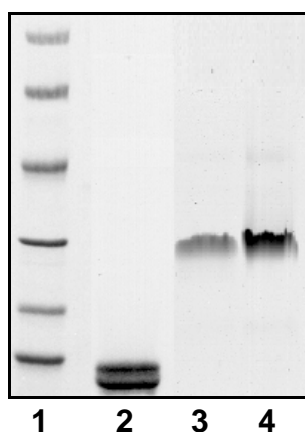


Abb. 4.20. SDS-PAGE-Analyse zur Überprüfung der Gleichgewichtshypothese (s.Text) bei der Dimerisierung von PDGF. **1** Markerproteine (kDa): 94 (oben); 67; 43; 30; 20,1; 14,4; **2** Gereinigte PDGF-A/B-Monomere; **3** natives PDGF-AB; **4** natives Dimer nach 100 h Inkubation in $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH, $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG.

← PDGF-AB-Dimer

← PDGF-Monomere A (oben) und B (unten)

Gnd-HCl, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH, $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG). Nach 100 h war kein Monomer in der SDS-PAGE nachweisbar (Abb. 4.20). Damit ist eindeutig gezeigt, daß eine Gleichgewichtseinstellung bei der Dimerisierung von PDGF-A/B nicht für den unvollständigen Umsatz verantwortlich ist.

4.2.2.6.2 Aggregation

Die Aggregation teilgefalteter Intermediate stellt mit steigender Proteinkonzentration häufig die wichtigste Nebenreaktion dar. Kiefhaber et al. (1991) formulierten ein einfaches Modell zur Beschreibung der Aggregation als Konkurrenz zur Faltung. Dieses fußt auf der Annahme, daß die Faltung mit einer Reaktionsordnung von 1 abläuft, die der Aggregation dagegen mit einer von 2. Weiterhin setzt das Modell Aggregate nur einer Größe mit jeweils gleicher Anzahl Faltungsintermediate voraus (Abschnitt 2.6.4). Die Autoren konnten damit die experimentellen Daten der Renaturierung der porcinen Muskel-Laktat-Dehydrogenase erfolgreich beschreiben. Das Modell wurde auch zur Beschreibung der *in vivo* - Aggregation angewendet.

Der Einfluß der Aggregation auf die Dimerisierung von PDGF wurde mit diesem Modell für die Konzentrationen $1,9$ und $47 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (24 bzw. $584 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstante von $1,5\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ untersucht. Die Geschwindigkeitskonstante K_2 der Aggregation wurde durch Anpassung erhalten und zu $0,31 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ bestimmt. Abb. 4.21 veranschaulicht die zeitlichen Verläufe des experimentellen und simulierten Monomerumsatzes.

Die experimentellen Daten für eine Monomeranfangskonzentration von $47 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($584 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und der zugehörige simulierte Kurvenverlauf stimmen gut überein. Für eine Monomeranfangskonzentration von $1,9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) weichen experimentelle und simulierte Daten deutlich voneinander ab. Dieser Befund läßt sich mit einer geringeren Neigung zur Aggregation bei niedrigen Proteinkonzentrationen interpretieren. Nach Gleichung 2.20 wäre eine Ausbeute von 98 % für diese Konzentration zu erwarten. Gefunden wurde jedoch ein Wert von etwa 60 %. Weiterhin gibt es für ein hohes Ausmaß an Aggregation nach der Gelfiltration keine experimentellen Anhaltspunkte im Rahmen der verwendeten Analytik (wie z.B.

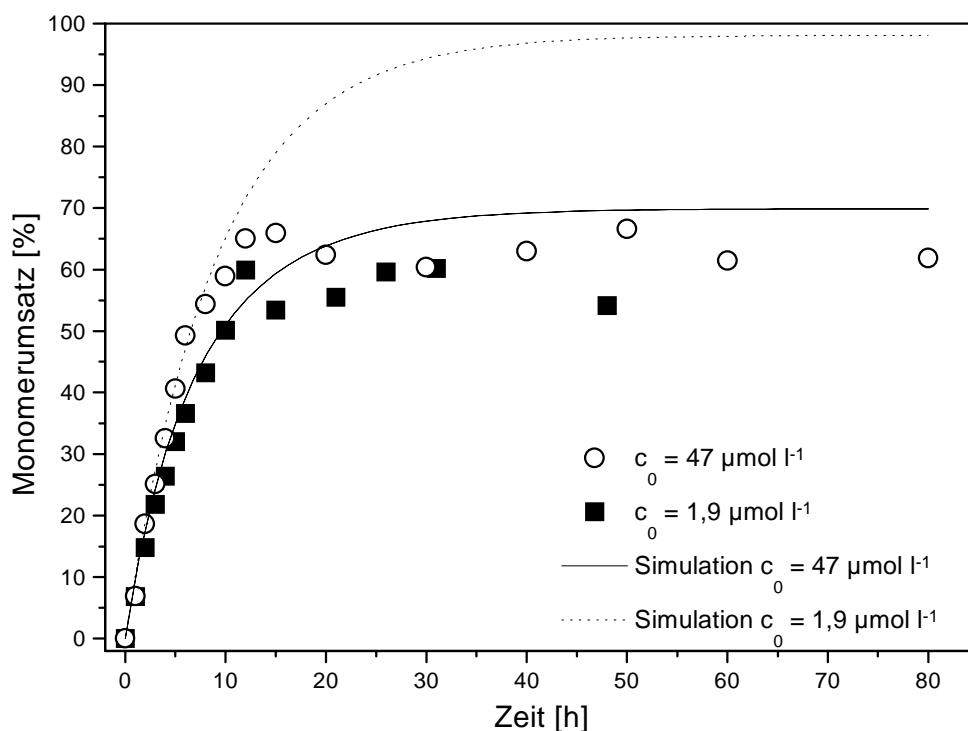


Abb. 4.21: Einfluß der Aggregation nach dem Modell von Kiefhaber et al. (1991) auf die Dimerisierung von PDGF-A/B. Zeitlicher Verlauf des experimentell ermittelten und simulierten Monomerumsatzes für Anfangskonzentrationen von $584 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($47 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; ○) und $24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; ■); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$; $k_1 = 1,5\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_2 = 0,31 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

sichtbare Trübung, Lichtstreuung bei $\lambda_{\text{em.}} = 280 \text{ nm}$). Lediglich bei 45°C wurde eine sichtbare Trübung im Reaktionsansatz festgestellt (Abschnitt 4.2.2.4.1). Dem unvollständigen Umsatz der Monomere müssen demnach andere Ursachen zugrunde liegen.

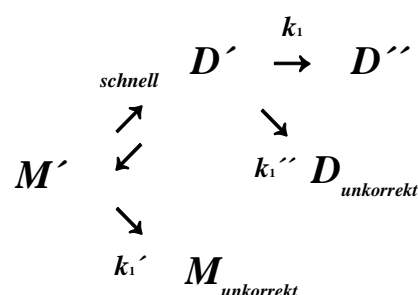
4.2.2.6.3 Unkorrekt gefaltete Intermediate

Nicht korrekt gefaltete Monomere, die unfähig zur spezifischen Assoziation sind, oder Dimere, die keine Disulfidbrücken ausbilden können, könnten als weiterer Erklärungsansatz für den unvollständigen Umsatz dienen. Eine solche Spezies kann dabei sowohl während als auch nach der Gelfiltration gebildet werden.

Philo et al. (1993) beschrieben bei der Renaturierung des dimeren BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ein nicht assoziationskompetentes Intermediat, das Eigenschaften eines "molton globule"-Zustandes aufweist und von dem aus die Weiterreaktion nur sehr langsam erfolgt. Zur Interpretation der experimentell ermittelten Reaktionsordnung von eins wurde eine Gleichgewichtsreaktion sowohl innerhalb des Faltungsweges als auch dazu parallel formuliert (Abschnitt 2.2.5.2, Schemata 4a und 4b). Beide Modelle wiesen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten auf. Angaben zum Umsatz wurden jedoch nicht gemacht.

Prinzipiell läßt sich diese Betrachtung auch auf PDGF übertragen. Jedoch ist die Formulierung eines Gleichgewichtes zur Erklärung eines unvollständigen Umsatzes in diesem Falle nicht statthaft. Ein Gleichgewicht liefert ständig Produkte in die Richtung nach, von wo aus eine Weiterreaktion erfolgt. Ist in der Reaktionsfolge nach dem Gleichgewicht ein irreversibler Teilschritt vorhanden, so resultiert nach unendlicher Reaktionszeit ein vollständiger Umsatz. Dies gilt sowohl für ein Gleichgewicht innerhalb der Reaktionsfolge als auch für ein dazu paralleles Gleichgewicht.

Zur Beschreibung des gefundenen unvollständigen Umsatzes ist es daher notwendig, eine irreversible Reaktion zu postulieren, die parallel zur Renaturierung abläuft. Folgendes Schema verdeutlicht die Situation:



Schema 7: Bildung unkorrekt gefalteter Monomere bzw. Dimere über eine irreversible Reaktion 1. Ordnung parallel zur Renaturierung

Die monomeren Faltungsintermediate aus der Gelfiltration (M') können einerseits auf dem Renaturierungsweg zu D' assoziieren und in einer geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion mit k_1 zu D'' reagieren oder parallel intramolekular mit k_1' bzw. k_1'' eine Konformation einnehmen ($M_{\text{unkorrekt}}$ bzw. $D_{\text{unkorrekt}}$), die für eine Assoziation bzw. für die Ausbildung der intermolekularen Disulfidverbrückungen nicht geeignet ist. Für die

nachfolgende mathematische Beschreibung sind beide möglichen Parallelreaktionen zu $M_{\text{unkorrekt}}$ bzw. $D_{\text{unkorrekt}}$ als identisch anzusehen.

Die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration von M' läßt sich dann formulieren zu (Connors, 1990):

$$-\frac{d[M']}{dt} = k_1 \cdot [M'] + k_1' \cdot [M'] \quad (4.3)$$

Nach Zusammenfassen der beiden Geschwindigkeitskonstanten zu $k = k_1 + k_1'$ und Integration von Gl. 4.3 folgt für die zeitliche Abhängigkeit des Eduktes M' :

$$[M'] = [M']_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (4.4)$$

Für die beiden Produkte D'' und $M_{\text{unkorrekt}}$ gelten nach Integration:

$$[D''] = [D'']_0 + \frac{[M']_0 \cdot k_1}{k} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (4.5)$$

bzw.

$$[M_{\text{unkorrekt}}] = [M_{\text{unkorrekt}}]_0 + \frac{[M']_0 \cdot k_1'}{k} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (4.6)$$

Das Modell wurde an den experimentellen Daten überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.22 dargestellt. Der zeitliche Verlauf der experimentell ermittelten Dimerkonzentration (D'') kann mit Gl. 4.5 und $k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ als Initialisierungsparameter in guter Übereinstimmung simuliert werden. Die Geschwindigkeitskonstante k_1' bzw. k_1''

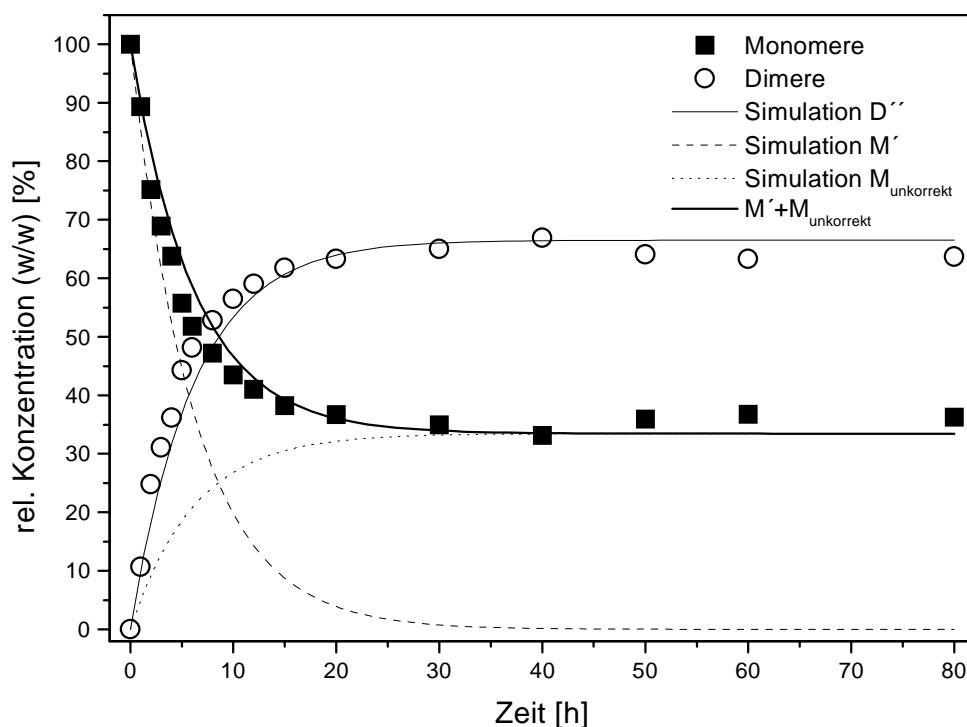


Abb. 4.22: Interpretation des unvollständigen Monomerumsatzes bei der Dimerisierung von PDGF unter Annahme unkorrekt gefalteter Intermediate mit Hilfe einer irreversiblen Parallelreaktion 1. Ordnung. Zeitliche Verläufe der experimentell ermittelten relativen Monomer- (■) und Dimerkonzentrationen (○) sowie Simulation der gebildeten Spezies nach Gl. 4.4 - 4.6 ($k_1 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; k_1' (bzw. k_1'') = $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). PDGF-A/B: $110 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($8,9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GSSG; $T=25^\circ\text{C}$.

der Parallelreaktion wurde durch Anpassung zu $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ erhalten. Der Verlauf der simulierten Monomerkonzentration M' nach Gl. 4.4 zeigt einen vollständigen Umsatz an. Komplementär dazu findet die Bildung des Dimers D'' und der postulierten unkorrekt gefalteten Spezies $M_{\text{unkorrekt}}$ bzw. $D_{\text{unkorrekt}}$ nach Gl. 4.6 statt. Diese Spezies sind in der nicht reduzierenden SDS-PAGE - Analyse nicht von dem monomeren Faltungsintermediat M' zu unterscheiden, so daß experimentell die Summe aller nicht disulfidverbrückter Spezies in Form von Monomeren erfaßt wird. Der experimentelle zeitliche Verlauf der relativen Monomerkonzentration läßt sich somit durch Addition der Gl. 4.4 und 4.6 beschreiben (fett ausgezogene Kurve).

4.2.3 Untersuchung der Dimerisierung mittels Fluoreszenzspektrometrie

Bei der Dimerisierung von PDGF bildet sich in räumlicher Nähe zum Tryptophanrest eine Disulfidbrücke aus, die fluoreszenzlöschende Eigenschaften besitzt (Abschnitt 2.5). Somit sollte sich die Dimerisierungsreaktion als Funktion der Fluoreszenzintensität zeitlich verfolgen lassen. Parallel zur SDS-PAGE - Analyse der Dimerisierung wurde deshalb zusätzlich auch die Fluoreszenzspektrometrie herangezogen. In Abb. 4.23 sind die Fluoreszenzspektren der Dimerisierung von PDGF-A/B bei $t = 0$ h und $t = 20$ h (A) sowie der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität (B) gezeigt. Zu sehen

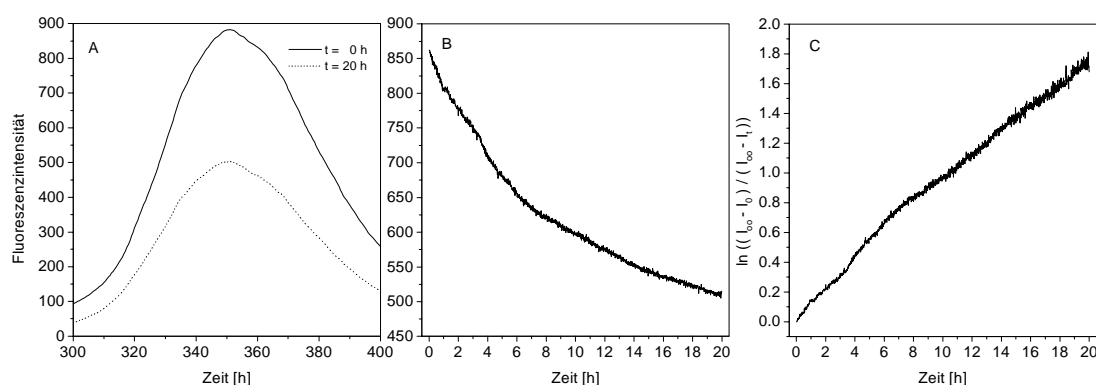


Abb. 4.23: Fluoreszenzspektrometrische Untersuchung der Dimerisierung von PDGF-A/B. **A** Spektren der Probe bei $t = 0$ h und $t = 20$ h; **B** Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität; **C** Linearisierte Auftragung bei Annahme einer Reaktion erster Ordnung nach Gl. 2.21 zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten. PDGF-A/B: $110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 300\text{-}400 \text{ nm}$ (A) bzw. 350 nm (B und C).

ist eine Intensitätsabnahme auf etwa 60 % des Ausgangswertes (A). Diese Abnahme erfolgt exponentiell (B). Aus der linearisierten Auftragung der Intensität unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung (Gl. 2.21) wurde die Geschwindigkeitskonstante k_1 der Dimerisierung zu $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ berechnet und liegt damit sehr nah an dem durch SDS-PAGE bestimmten Zahlenwert von $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Es wird damit festgestellt, daß beide Analytikmethoden unter Ausnutzung unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften konsistente Daten zur Dimerisierung von PDGF liefern.

4.3 Renaturierung von PDGF mittels Verdünnung

In den vorangegangenen Ausführungen wurde die Renaturierung von PDGF im wesentlichen im Hinblick auf die Dimerisierungsreaktion diskutiert. Auf den Faltungsweg von PDGF bezogen, handelte es sich dabei um die Untersuchung später Intermediate. Diejenigen Faltungsprozesse, die bei der Initiierung der Faltung während der Gelfiltration stattfinden, konnten naturgemäß nicht analysiert werden. Insbesondere frühe Intermediate jedoch neigen häufig zur Aggregation. Zur näheren Untersuchung des frühen Faltungsgeschehens wurde die Renaturierung von PDGF zusätzlich mit der Verdünnungsmethode durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Faltung wurde anhand der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{em.}} = 350 \text{ nm}$) aufgezeichnet. Die Analyse der Aggregatbildung erfolgte mittels statischer Lichtstreuung ($\lambda_{\text{em.}} = 280 \text{ nm}$).

4.3.1 Fluoreszenzspektrometrische Analyse der Renaturierung von PDGF durch Verdünnung

Die Renaturierung des denaturierten und reduzierten PDGF erfolgte durch Verdünnung der Gnd-HCl-Konzentration auf 0 bis $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in verschiedenen Ansätzen. Die Proteinendkonzentration und die Redoxbedingungen wurden ebenfalls variiert. Dabei wurde in einigen Fällen ein ungewöhnlicher zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität gefunden. Ein Beispiel dazu ist in Abb. 4.24 gezeigt.

Die Intensität nimmt zunächst stark ab und erreicht nach ca. 1 h einen für zwei Stunden konstanten Wert. Ab $t = 3 \text{ h}$ ist ein exponentieller Abfall der Intensität im Stundenbereich zu beobachten. Bei Einteilung des Gesamtverlaufes in zwei unterschiedliche Phasen (Phase 1 von 0 bis 3 h; Phase 2 von 3 bis 22 h) wird für Phase 2 unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung eine Geschwindigkeitskonstante von $0,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ erhalten. Dies entspricht der Größenordnung der Geschwindigkeitskonstante für die Dimerisierung von PDGF-A/B. Möglicherweise repräsentiert dieser Fluoreszenzverlauf die Dimerisierungsreaktion. Weitere ins Detail gehende Untersuchungen zu diesem Sachverhalt wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Da die Moleküle im Reaktionsansatz verschiedenartig reagieren

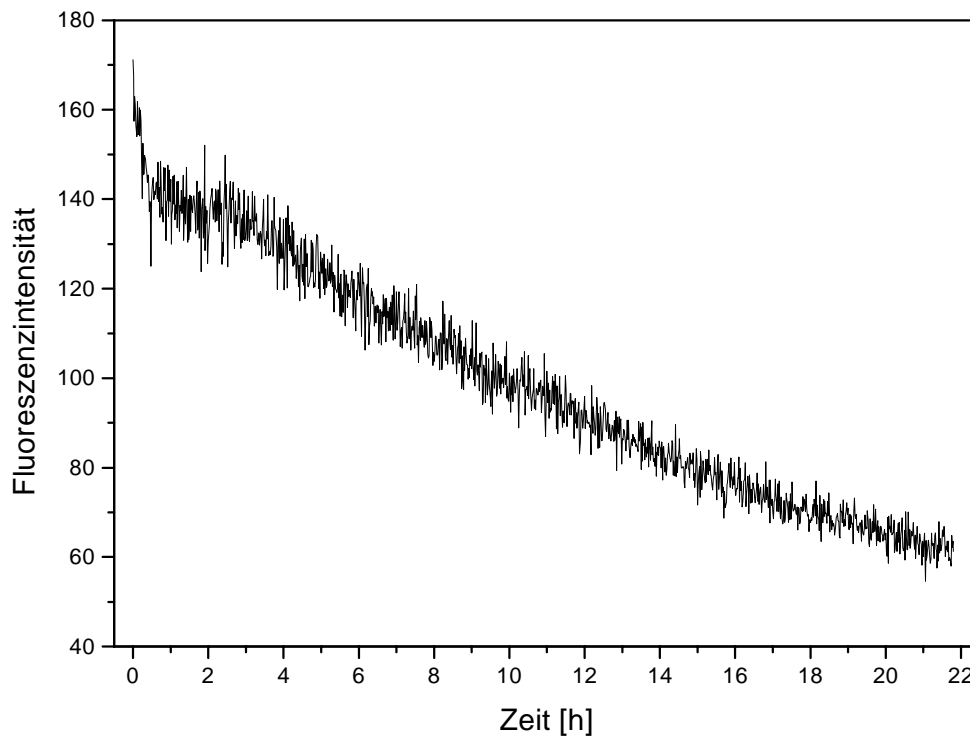


Abb. 4.24: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Renaturierung von PDGF-A/B mittels Verdünnung. PDGF-A/B: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); Puffer: $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8, $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 350 \text{ nm}$.

können, resultiert eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies, die allesamt zum beobachteten Gesamtfluoreszenzsignal beitragen. Neben Monomeren, Dimeren und Aggregaten ist auch die Bildung der erwähnten unkorrekt gefalteten Monomere bzw. Dimere zu berücksichtigen. Ein solcher komplexer Verlauf wurde für Proteinkonzentrationen von 5 und $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,4$ bzw. $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Anwesenheit von $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl sowie $0,25$ bis $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG gefunden.

Am Ende der Messung wurde ein Spektrum aufgenommen, anschließend die Probe zur Abtrennung der Aggregate filtriert (Ausschlußgrenze 100 kDa) und vom Filtrat wiederum ein Spektrum aufgenommen. Die verbleibende Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ gegenüber der am Ende der Messung ist somit um die Intensität der Aggregate bereinigt und ermöglicht somit eine grobe Abschätzung des Ausmaßes der Aggregation. Dazu wurde die Annahme gemacht, daß die Aggregate ähnliche fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften wie die Monomere und Dimere besitzen. Zettlmeissl et al. (1979) identifizierten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Proteinaggregaten hochstrukturierte Bereiche mit nativen spektroskopischen

Eigenschaften (Abschnitt 2.2.4), die diese Annahme stützen. Demnach wurde der Anteil der Aggregation für eine Proteinkonzentration von $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Gegenwart von $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl zu 50 % bestimmt.

Einen vergleichbaren ungewöhnlichen Fluoreszenzverlauf beschrieben Jaenicke et al. (1979) bei der Renaturierung der dimeren porcinen Malat-Dehydrogenase aus Mitochondrien (mMDH; Abschnitt 2.2.5.1). Dabei folgte einem starken Abfall der Fluoreszenzintensität in den ersten 60 s eine etwa 8 min dauernde Phase fast konstanter Intensität, die daraufhin exponentiell im Stundenbereich weiter abfällt. Dem anfänglichen schnellen Intensitätsrückgang wurde die Bildung eines Intermediates zugeordnet, das einen stabilen Faltungskeim für den weiteren Prozess darstellt (Karplus und Weaver, 1976). Teipel und Koshland (1971) dokumentierten bei der Renaturierung von Enolase und Aldolase aus Kaninchenmuskel einen zunächst steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität in den ersten 30 s, gefolgt von einem exponentiellen Abfall auf etwa die Hälfte des Intensitätsanstiegs (bei $t = 30 \text{ min}$) für Enolase und etwa 80 % bei $t = 15 \text{ min}$ für Aldolase. Dieses Verhalten führten die Autoren auf Konformationsänderungen in der Nachbarschaft der aromatischen Aminosäuren zurück, die jedoch auf die Gesamtstruktur keinen Einfluß nahmen, wie die unveränderte optische Rotationsdispersion (ORD) belegt. Detailliertere Angaben wurden nicht gemacht. Es ist durchaus denkbar, daß ähnliche Prozesse auch für den Fluoreszenzverlauf bei der Renaturierung von PDGF verantwortlich sind.

4.3.2 Untersuchungen zur Aggregatbildung bei der Renaturierung von PDGF-A/B durch Verdünnung

Parallel zur Fluoreszenzmessung wurde das Ausmaß gestreuten Lichtes als statische Lichtstreuung (Detektion im 90° -Winkel zur Anregung) bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda_{\text{em.}} = 280 \text{ nm}$ (Rayleigh-Streuung) zeitlich verfolgt. Diese Methode erlaubt die qualitative Untersuchung der Aggregatbildung. Quantitative Daten zur Größe (molare Masse) und Form von Makromolekülen lassen sich dagegen nur über die dynamische Lichtstreuung erhalten. Es wurden unterschiedliche Protein-, Gnd-HCl- sowie Glutathionkonzentrationen untersucht. Tab. 4.6 faßt die Ergebnisse zusammen. Dargestellt sind die Absolutwerte der Lichtstreuintensität nach Erreichen eines

konstanten Signals sowie die relativen Intensitäten gegenüber dem Standardsystem aus Abschnitt 3.7.2 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vorgereinigte, denaturierte und reduzierte PDGF-A/B-Monomere; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG, $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 280 \text{ nm}$).

Tab. 4.6: Effekt der Umgebungsparameter auf die Lichtstreuintensität zur Abschätzung der Aggregatbildung

Parameter	Konzentration	absolute Lichtstreu- intensität bei konstantem Signal	relative Lichtstreu- intensität
Proteinkonzentration [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	5	95	0,6
	10	155	1
	50	165	1,1
	100	290	1,9
Gnd-HCl- Konzentration [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	0	410	2,7
	0,1	290	1,9
	0,25	180	1,2
	0,5	155	1
	1,0	140	0,9
	1,2	100	0,7
	1,5	100	0,7
GSSG-Konzentration [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]; GSH-Konzentration konstant ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0 (ohne Redoxsystem)	210	1,4
	0,25	155	1
	0,5	125	0,8
	1,0	95	0,6
	2,0	115	0,7

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß zu höheren Proteinkonzentrationen die Lichtstreuintensität und damit das Ausmaß der Aggregation zunimmt. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration von 10 auf 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ liefert eine um den Faktor 1,9 höhere Lichtstreuintensität. Der Einfluß der Konzentrationen des Redoxsystems ist gering. Lediglich bei Abwesenheit des Redoxsystems ist eine 1,4fache Erhöhung des Lichtstreusignals gegenüber dem Standardsystem zu beobachten. Dies läßt sich mit der irreversiblen Bildung nicht nativer Disulfidbrücken durch Luftoxidation interpretieren, die schließlich zur Aggregation führen. Eine Verringerung der Gnd-HCl-Konzentration von 0,5 auf 0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hat ein 2,7fach höheres Lichtstreusignal zur Folge und zeigt damit gegenüber den beiden anderen Parametern den größten Einfluß auf die Renaturierung von PDGF. Der ähnlich große Einfluß der Gnd-HCl-Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstante und den Monomerumsatz bei der Dimerisierung von PDGF wurde bereits beschrieben (Abschnitt 4.2.2.4.2).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei der Renaturierung von PDGF-A/B durch Verdünnung die Aggregation eine wesentliche Rolle spielt. Auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen ist die Aggregatbildung zu einem gewissen Anteil beteiligt. Dieser Anteil wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektren vor und nach Filtration der Probe zu 50 % bestimmt (Abschnitt 4.3.1). Demgegenüber wurde bei Renaturierung mittels Gelfiltration eine weitaus geringere Beteiligung der Aggregation gefunden (< 10 %); bei gleichzeitigem Einsatz hoher Proteinkonzentrationen.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen daher die allgemeine Annahme, daß die Aggregation weitgehend auf das frühe Faltungsgeschehen beschränkt ist (Abschnitt 2.2.4). Im folgenden werden diese Ergebnisse zur Diskussion der Vorgänge während der Gelfiltration herangezogen.

4.4 Analyse des Renaturierungsvorgangs während der Gelfiltration

Gegenüber der Nutzung der Gelfiltration als Reinigungsverfahren für biologisch aktive Proteine, die sich während der Chromatographie in ihren Eigenschaften nicht ändern, sind bei Nutzung als Verfahren zur Renaturierung zusätzlich die komplexen Konformationsänderungen innerhalb der Moleküle einzubeziehen. Abb. 4.25 verdeut-

licht die einzelnen Schritte der Renaturierung während der Gelfiltration. Die Aspekte der Beladung der Säule, der Initiierung der Renaturierung sowie der Faltung und Separation werden in den nachfolgenden Unterkapiteln näher diskutiert.

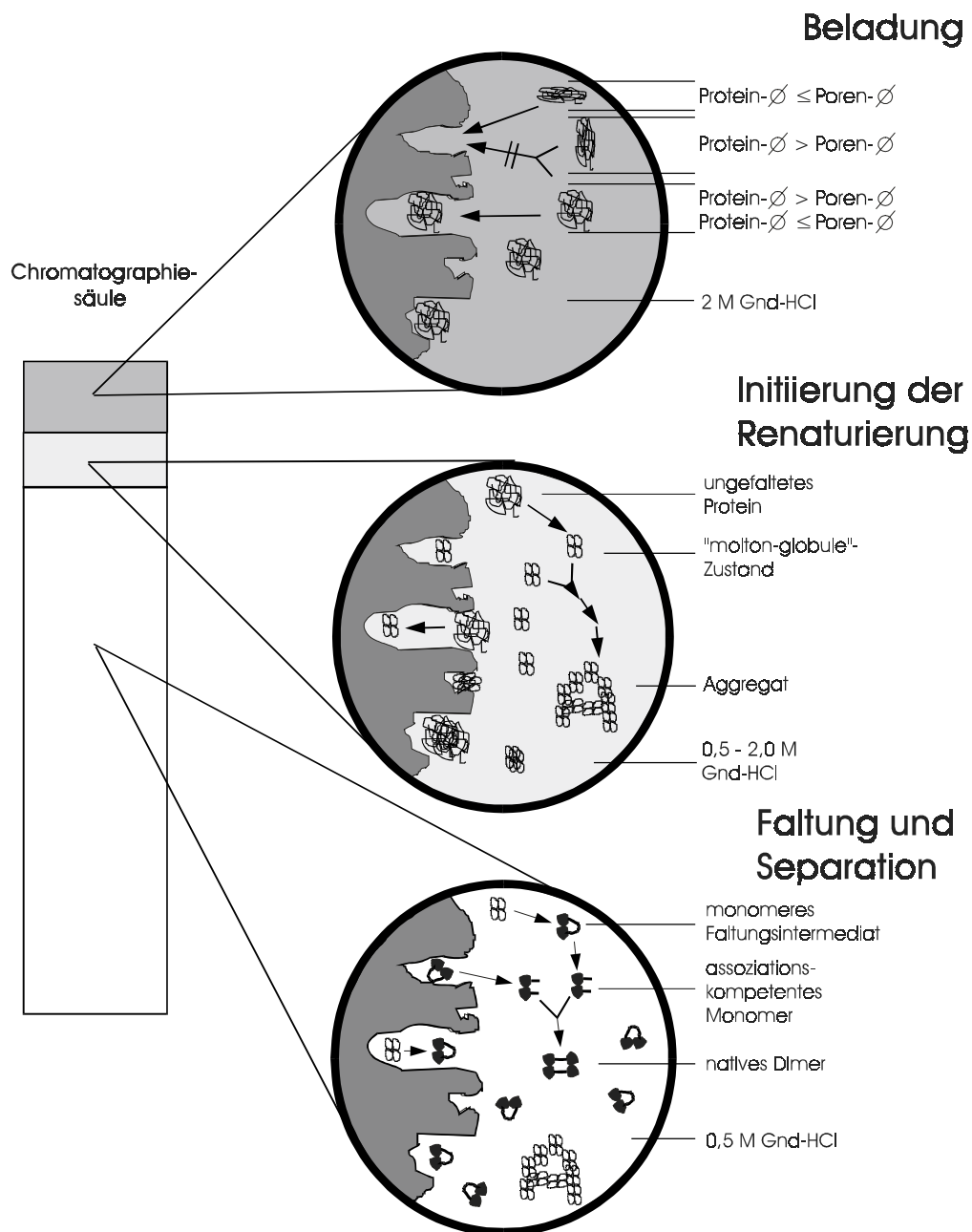


Abb. 4.25: Schematische Darstellung des Renaturierungsprozesses während der Gelfiltration. Einteilung in drei Teilschritte: **oben** - Beladung unter denaturierenden Bedingungen ($2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl); **Mitte** - Initiierung der Renaturierung durch Pufferaustausch ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl); **unten** - weitere Faltung und Separation gebildeter Aggregate.

4.4.1 Beladung der Säule

Die Beladung der Säule (Abb. 4.25 oben) mit denaturiertem und reduziertem Protein erfolgt unter denaturierenden Bedingungen ($2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl). Die Moleküle verteilen sich in die zur Verfügung stehenden Poren der Gelmatrix und in die interpartikulären Zwischenräume. Dabei ist zu beachten, daß vollständig denaturierte und reduzierte Proteine ein statistisches Knäuel mit annähernder Kugelsymmetrie darstellen, dem eine hohe Flexibilität (Verformbarkeit) zugeschrieben wird (Holtzhauer, 1996). Der Stokes-Radius dieser Spezies entspricht in vielen Fällen dem Zweifachen des Radius im nativen Zustand (Corbett, 1984). Die Verformbarkeit der Moleküle führt dazu, daß zusätzlich auch deren Orientierung zur Pore für die Porendiffusion relevant ist. Mit dem größeren Radius ist daher auch eine geringere Porenausnutzung verbunden, die zu einem geringeren Elutionsvolumen dieser Spezies führt. Für vollständig denaturiertes und reduziertes PDGF in Gegenwart von $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl (Aufreinigungsbedingungen, Abschnitt 4.1) wurde die Ausnutzung des zur Verfügung stehenden Porenvolumens zu 17 % berechnet (Tab. 4.7, Abschnitt 4.4.3). 21 % der PDGF-Moleküle befinden sich dabei in den Poren und 79 % in den Partikelzwischenräumen. Diese Zahlenwerte wurden aus dem PDGF insgesamt zur Verfügung stehenden Volumen $V_e = V_0 + V_{P,e}$ (Abschnitt 2.4) berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Anteil PDGF in Poren} &= \frac{V_{P,e}}{V_e} \\ \text{Anteil PDGF in Zwischenräumen} &= \frac{V_0}{V_e} \end{aligned} \quad (4.7)$$

mit	$V_{P,e}$	PDGF zur Verfügung stehendes Porenvolumen	[ml]
	V_e	Elutionsvolumen von PDGF	[ml]
	V_0	Ausschlußvolumen der Gelpackung	[ml]

Die Berechnung setzt eine statistische Verteilung der Moleküle im gesamten nutzbaren Volumen voraus. Das bedeutet, daß z.B. Wechselwirkungen mit der Gelmatrix (z.B. Adsorption) nicht zu einer Bevorzugung der Porendiffusion führen.

4.4.2 Initiierung der Renaturierung

Der Wechsel des Eluenten führt zu einer Verdünnung der denaturierenden Konzentration des Gnd-HCl von 2 auf $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, das aufgrund seiner geringeren Größe gegenüber den Proteinmolekülen stärker als diese zurückgehalten wird, so daß ein schmaler Bereich mit einem Gnd-HCl-Konzentrationsgradienten entsteht (Abb. 4.25 Mitte). Hier herrschen Bedingungen, die sekundäre und tertiäre Kontakte der Aminosäuren untereinander ermöglichen. Die ungefalteten Proteine bilden schnell ein Intermediat mit Eigenschaften eines "molton globule"-Zustandes (Abschnitt 2.2.4; Ptitsyn et al. 1992; Christensen und Pain, 1994; Hlodan et al.; 1995), der mit einer Verringerung des Stokes-Radius bzw. hydrodynamischen Radius einhergeht. Danach kann das Protein auf seinem Faltungsweg weiter zur nativen Struktur finden. Auch intermolekulare Kontakte finden statt. Gebildete Aggregate können nicht in die Poren diffundieren und eluieren daher früher (Abb. 4.25 unten).

4.4.3 Faltung von PDGF während der Chromatographie

Für die Betrachtung der Faltung von PDGF während der Chromatographie wurden zunächst die Porenausnutzung und die Verteilung der Monomere in den Poren und den Partikelzwischenräumen nach Gl. 4.7 (Abschnitt 4.4.1) berechnet. Tab. 4.7 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 4.7: Porenvolumennutzung der PDGF-Monomere

Gnd-HCl [mol l ⁻¹]	V _e [ml]	K _d	genutztes Porenvolumen		Verteilung [%] *	
			[ml]	[%]	Poren	Zwischen- räume
0	194	0,40	72	40	37	63
0,25	169	0,26	47	26	28	72
0,5	161	0,21	39	21	24	76
2,0	155	0,18	33	18	21	79

* unter Annahme einer statistischen Verteilung

Unter den Renaturierungsbedingungen ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl) nutzt PDGF 21 % des gesamten Porenvolumens. Dabei befinden sich nur 24 % der Moleküle in den Poren und 76 % in den Zwischenräumen. Geringere Gnd-HCl - Konzentrationen führen zu einer besseren Porenausnutzung (40 % bei Abwesenheit von Gnd-HCl). Umso überraschender ist die Beobachtung, daß das Ausmaß irreversibler Aggregationsreaktionen sehr gering ist ($< 10 \%$, Abschnitt 4.2.1.2). Wechselwirkungen mit der Matrix wie z.B. elektrostatische oder hydrophobe Adsorption können unter den gewählten Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden (Anspach, 1998).

Dieses statische Konzept (siehe Potschka, 1987) unter Voraussetzung einer Gleichgewichtsverteilung der Moleküle im verfügbaren Porenvolumen und den interpartikulären Zwischenräumen kann die Beobachtung des geringen Ausmaßes an Aggregation nicht erschöpfend erklären, da die Porendiffusion offensichtlich keine entscheidende Rolle spielt.

Der Zusatz von $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl zum Renaturierungspuffer ist zum Teil für den geringeren Anteil an Aggregation verantwortlich. Während die Wiederfindung der Monomere bei der Gelfiltration in Abwesenheit von Gnd-HCl bei 50 % (Tab. 4.1) lag, wurde sie in Gegenwart von $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Gnd-HCl zu 83 % bestimmt. Die Lichtstreuungsmessungen während der Renaturierung von PDGF durch Verdünnung zeigen ebenfalls eine zunehmende Aggregation bei abnehmender Gnd-HCl - Konzentration (Abschnitt 4.3.2). Der Anteil der Aggregate bei niedrigen Proteinkonzentrationen ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) lag mit 50 % jedoch deutlich höher als der Anteil von unter 10 % bei der Chromatographie. Folglich hat die Natur des Chromatographieprozesses einen entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß der Aggregation.

Dem statischen Konzept gegenüberzustellen sind die dynamischen Konzepte, die auf der Betrachtung der Stofftransportphänomene durch Konvektion und Diffusion basieren (Potschka 1987). Besonders die Kenntnis der Porenstruktur (Durchflußkapillaren oder "dead end"-Poren) ist für die Berechnung der Transportvorgänge essentiell. Für das verwendete Superdex-Material sind jedoch keine Daten verfügbar (Rücksprache mit Fa. Pharmacia).

Batas und Chaudhuri (1996), Chaudhuri et al. (1996) und Batas et al. (1997) führen den Erfolg der Gelfiltration zur Minimierung der Aggregation auf ein dynamisches Konzept zurück. Hervorgehoben wird zunächst der weitgehende Ausschluß der denaturierten Polypeptidketten von der Porendiffusion durch deren großen hydrodynamischen Radius. Mit Beginn der Faltung verringert sich der hydrodynamische Radius drastisch, und die Moleküle können in die Poren diffundieren. Hier besteht eine weitgehende Abschirmung der partiell gefalteten Proteine gegenüber intermolekularen Kontakten. Diese führen die Autoren auf eine reduzierte Diffusion in den Poren zurück, die die Moleküle dort im zeitlichen Mittel länger verharren läßt. Nach Abschluß der Faltungsreaktion eluieren native Proteine.

Werner et al. (1994) stellten die These auf, daß der Prozeß der Gelfiltration irreversible Bedingungen für die Renaturierung und Assoziation schafft. Aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Eigenschaften werden die Intermediate irreversibel aus dem Faltungsgleichgewicht entzogen und zur nativen Konformation geführt.

Experimentelle Daten, die die beschriebenen Schlußfolgerungen belegen, wurden von beiden Autorengruppen nicht vorgestellt. Potschka (1987) weist auf das Fehlen einer experimentellen Studie hin, aus der eine eindeutige statische oder dynamische Natur der Schlüsselparameter der Gelfiltration hervorgeht. Zur Interpretation verschiedener Teilaspekte wurden wahlweise statische oder dynamische Konzepte herangezogen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Minimierung der Aggregation im Falle von PDGF entscheidend durch den Chromatographieprozeß bestimmt wird. Weder statische noch dynamische Konzepte können diesen Effekt erschöpfend erklären.

4.4 Potential der Gelfiltration zur Renaturierung von Proteinen

Trotz des Fehlens einer fundierten wissenschaftlichen Grundlage zur Beschreibung der komplexen Vorgänge der Renaturierung während der Gelfiltration ist das Potential dieser Technik zur Renaturierung rekombinanter Pharmaproteine sehr groß (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Potential der Gelfiltration zur Renaturierung von Proteinen

Protein	Gelfiltration	Proteinkonz. [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]		Ausbeute aktives Protein [%]	Literatur
	Material; Gelpackung [mm]; Beladung [ml]	Proben- auftrag	Eluat		
Lysozym (Monomer, 18 kDa)	Sephacryl S-100; 26 x 880; 1,5	1,6 - 80,2	0,02 - 0,71	60 - 46 *	Batas et al., 1996
Carboanhydrase B (Monomer, 30 kDa)	Sephacryl S-100; 26 x 280; 1,0	11,3 - 63,2	0,56 - 1,12	76 - 42	Batas et al., 1996
rETS-1 (Monomer, 42 kDa)	Superdex 75 HR; 10 x 300; k. A.	1,0 - 10,0	0,2 - 2,0	71	Werner et al., 1994
Ribonuclease A (Monomer,)	Sephacryl S-100; 26 x 1000; k. A.	1,0 - 10,0	0,05 - 0,5	≥ 90	Werner et al., 1994
IHF (Heterodimer, 22 kDa)	Sephacryl S-100; 26 x 1000; k. A.	1,0 - 10,0	0,05 - 0,5	60	Werner et al., 1994
C1-Inhibitor (Monomer, 71 kDa)	Superose 6 HR; 10 x 300; 0,2	5,0 - 10,0	0,2 - 0,4	25 bzw. 47 **	Gauthier et al., 1997
PDGF (Homo- bzw. Heterodimer, 25 kDa)	Superdex 75 pg; 26 x 655; 1,0	2,5 - 5,0	0,12 - 0,25	bis 76 ***	diese Arbeit

* maximale Ausbeute 83 % bei $9,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Probenauftrag

** abhängig von Denaturierungsbedingungen, Angabe nur für Monomerfraktion

*** Gesamtausbeute nach Dimerisierung; abhängig von den gewählten Renaturierungsbedingungen

Sämtliche Autoren beschreiben die Gelfiltrationsmethode als besonders geeignet für die Gewinnung biologisch aktiver Proteine. Die Methode ist universell einsetzbar für kleine und große Proteine mit und ohne Disulfidverbrückungen, läßt hohe Proteinkonzentrationen zu und liefert höhere Ausbeuten gegenüber anderen Verfahren.

Lysozym konnte bei einer Probenauftragskonzentration von $41,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (entsprechend $0,41 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ im Eluat) mit einer Ausbeute von 58% renaturiert werden, während die Verdünnungsmethode mit einer Endkonzentration von $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lediglich 18 % lieferte. Aggregation während der Gelfiltration wurde zu geringem Ausmaß beobachtet, wobei keine Abhängigkeit von der Anfangskonzentration gefunden wurde. Eine Erklärung für das Auftreten eines Ausbeutemaximums (83 % bei $9,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) bei mittleren Konzentrationen wurde nicht gegeben. Proteinadsorption an die Gelmatrix wurde neben der Aggregation als Begründung für die unvollständige

Ausbeute angegeben. Der Renaturierungspuffer enthielt kein Salz zur Erhöhung der Ionenstärke, so daß Adsorptionseffekte zu erwarten sind. Die experimentellen Daten für Carboanhydrase B sind ähnlich gelagert.

Am Beispiel des IHF (integration host factor) aus *E. coli* wurde die Assoziation von Monomeren zu Dimeren bei Zusatz eines 30 Basenpaare langen DNA-Affinitätsliganden zum Renaturierungspuffer beschrieben. Allerdings geht aus den experimentellen Daten nicht zweifelsfrei hervor, ob die Assoziation während der Gelfiltration oder nach Elution erfolgte.

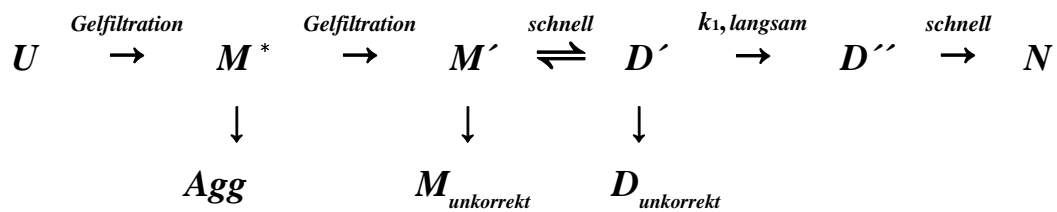
Die Renaturierung des C1-Inhibitors ergab eine monomere und eine höhermolekulare Peakfraktion. Die Monomerfraktion enthielt dabei abhängig von den vorgeschalteten Denaturierungsbedingungen zu 25 bzw. 47 % aktives Material.

Für PDGF wurde erstmals gezeigt, daß die Renaturierung mittels Gelfiltration auch in zwei Stufen erfolgen kann. Nach Elution der teilgefalteten Monomere findet die Dimerisierung zur nativen Spezies statt. Dies ermöglicht die selektive Optimierung beider Verfahrensschritte. Ebenfalls erstmals wurde die Renaturierung auch mit stark verunreinigten solubilisierten Einschlußkörpern erfolgreich durchgeführt. Dieser integrierte Ansatz der Renaturierung bei gleichzeitiger Abtrennung der Verunreinigungen unterstreicht das Potential dieser Methode zusätzlich. Die in Tab. 4.8 aufgeführten Autoren verwendeten ausschließlich reine Proteine, die zunächst denaturiert und dann renaturiert wurden.

Ein weiterer Ansatz zur Renaturierung von verunreinigten PDGF-Einschlußkörpern mittels Kationenaustauschchromatographie wurde von Kärst et al. (1997) beschrieben. Dabei wurde das PDGF-Solubilisat an einen Kationenaustauscher adsorbiert und anschließend mit einem Harnstoffgradienten die Renaturierung initiiert. Die Elution erfolgte mit einem stufenweisen NaCl-Gradienten.

4.5 Modell für die Renaturierung von PDGF

Die Kombination der vorgestellten experimentellen Daten erlaubt die Konstruktion eines wahrscheinlichen Reaktionsweges der Renaturierung von PDGF zur biologisch aktiven Spezies. Schema 8 faßt die Ergebnisse zusammen:



Schema 8: Wahrscheinlicher Renaturierungsmechanismus von PDGF

Die Initiierung der Renaturierung geschieht durch einen einfachen Pufferwechsel von denaturierenden zu nativen Bedingungen während der Gelfiltration. Dabei wird aus den denaturierten und reduzierten Polypeptidketten schnell ein Intermediat M^* gebildet, das Eigenschaften eines "molten globule"-Zustandes besitzt. Die Faltungsreaktion zu M' wird gegenüber der Aggregation durch die Gelfiltration und den Zusatz von Gnd-HCl in nicht denaturierender Konzentration favorisiert. Ein geringes Maß ($< 10\%$) Aggregation wurde jedoch beobachtet. Nach Elution der monomeren Spezies M' findet im Stundenbereich eine geschwindigkeitsbestimmende Dimerisierungsreaktion mit einer Reaktionsordnung von eins zu disulfidverbrückten Dimeren D'' statt. Die schnelle kovalente Verknüpfung der Cysteinreste zu intermolekularen Disulfidbrücken schließt die Renaturierung zum biologisch aktiven Protein (N) ab. Der unvollständige Umsatz der Monomere wurde auf die Bildung unkorrekt gefalteter Monomere $M_{\text{unkorrekt}}$ bzw. Dimere $D_{\text{unkorrekt}}$ zurückgeführt, die in einer irreversiblen Parallelreaktion erster Ordnung entstehen.

4.6 Charakterisierung von PDGF

Für sämtliche Untersuchungen zur Charakterisierung von PDGF-AB wurde das nach dem vorgestellten Verfahren renaturierte und feingereinigte PDGF-AB eingesetzt.

4.6.1 N-Terminus

Die gefundene Sequenz des N-Terminus für die ersten 12 Aminosäuren lautet:

PDGF-A-Kette: Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr

PDGF-B-Kette: Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met

Diese Sequenz ist mit humanem PDGF-AB identisch. Es wurden keine weiteren Sequenzen identifiziert, der N-Terminus ist somit homogen.

4.6.2 Zweidimensionale SDS-PAGE

Die zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Neben den beiden Spots der PDGF-Monomere A (oben) und B (unten) wurden mehrere weitere Spots mit geringerer Intensität unterhalb des A-Monomers gefunden (Abb. 4.26). Ursache für diese Heterogenitäten könnte ein heterogener C-Terminus sein.

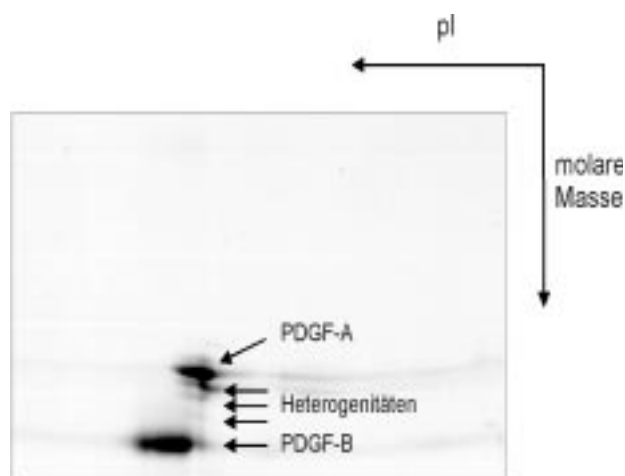


Abb. 4.26: Zweidimensionale reduzierende SDS-PAGE-Analyse von PDGF-AB

4.6.3 Fluoreszenzspektren

PDGF besitzt je einen Tryptophanrest in der A- und B-Kette (Abb. 2.1; Abschnitt 2.1.2). Diese befinden sich in beiden Ketten nur drei Aminosäuren weit entfernt von einem Cysteinrest, der in eine intermolekulare Disulfidbrücke eingebunden ist. In Abb. 4.27 sind die Spektren von biologisch aktivem und vollständig denaturiertem PDGF-AB zu

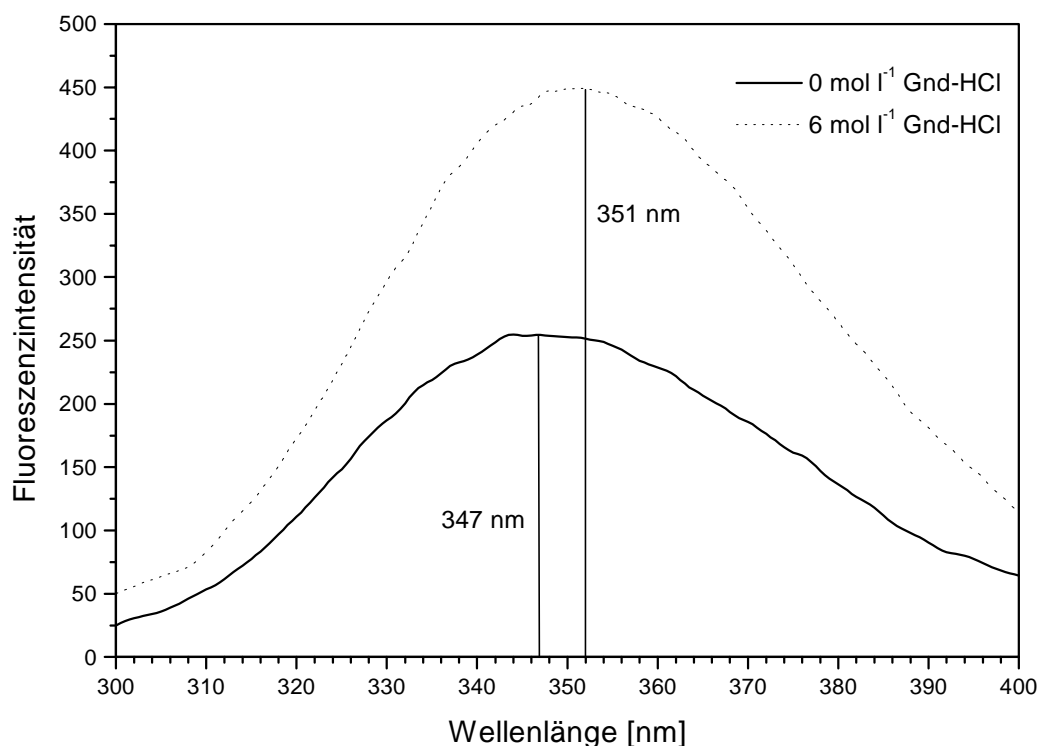


Abb. 4.27: Fluoreszenzspektren von nativem und vollständig denaturiertem PDGF-AB. PDGF-AB: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) Puffer nativ: $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,0; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; Puffer denaturiert: $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$.

sehen. Das Spektrum von biologisch aktivem PDGF-AB zeigt ein Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 347 \text{ nm}$. Dies ist ein Hinweis auf eine polare Umgebung des Tryptophanrestes, d.h. er befindet sich nicht im Inneren des Proteins, sondern an der zum Lösungsmittel exponierten Oberfläche (vgl. Abb. 2.1). In $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Gnd-HCl-Lösung, entsprechend einer vollständigen Denaturierung, ist das Emissionsmaximum nur geringfügig zu größeren Wellenlängen verschoben ($\lambda_{\text{max}} = 351 \text{ nm}$). Die Intensität ist um den Faktor 1,8 höher als im nativen Zustand. Craig et al. (1992) dokumentierten für die

Denaturierung verschiedener PDGF-BB - Mutanten die gleiche geringfügige bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von 347 nm nach 351 nm. Die gleichfalls beobachtete Intensitätserhöhung wurde mit dem Entfernen einer fluoreszenzlöschenden Gruppe aus der Tryptophanumgebung aufgrund der Denaturierung erklärt.

4.6.4 Chromatographisches Verhalten von PDGF

Das Verhalten von Proteinen in der Gelchromatographie ist stark abhängig von deren molarer Masse und geometrischer Form (Potschka, 1987; Athalye et al., 1992). Für PDGF als sehr flaches Molekül in seiner Monomer- und Dimerform sind daher Abweichungen im Laufverhalten gegenüber kugelsymmetrischen Proteinen zu erwarten. Abb. 4.28 zeigt die Verteilungskoeffizienten K_d verschiedener Standardproteine mit Kugelsymmetrie und PDGF als Funktion des Logarithmus der molaren Masse.

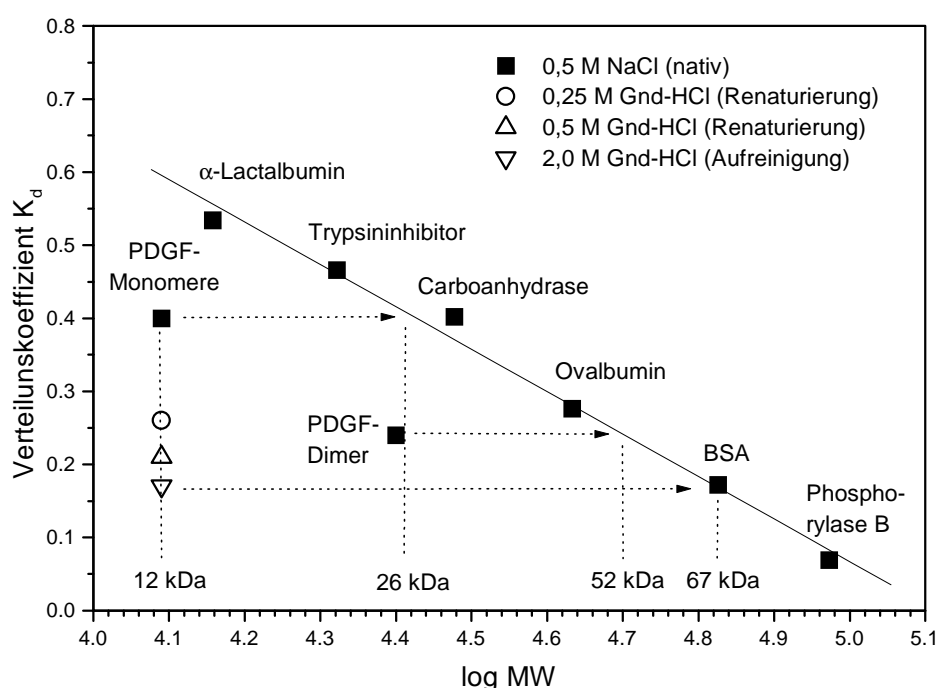


Abb. 4.28: Verhalten von PDGF bei der Gelfiltration im Vergleich zu Standardproteinen. Einfluß der Molekülgeometrie und der Umgebungsparameter. Native Bedingungen: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8; 0,5 mol·l⁻¹ NaCl; Renaturierungsbedingungen: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8; 0,25 bzw. 0,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl; 10 mmol·l⁻¹ GSH; 0,25 mmol·l⁻¹ GSSG; Aufreinigungsbedingungen: 0,05 mol·l⁻¹ Glycin/H₃PO₄ pH 3,0; 2 mol·l⁻¹ Gnd-HCl.

Die als Standard verwendeten Proteine weisen einen linearen Zusammenhang zwischen molarer Masse und Verteilungskoeffizient auf. Dies ist ein Ausdruck gleicher Symmetrie. PDGF dagegen liegt für sämtliche gewählten Bedingungen unterhalb der Geraden. Als Monomer verhält es sich ohne Gegenwart von Gnd-HCl wie ein kugelsymmetrisches Protein doppelter molarer Masse (ca. 26 kDa). Die Anwesenheit geringer Gnd-HCl - Konzentrationen (0,25 bzw. 0,5 mol l⁻¹) bei der Renaturierung wirkt sich bereits stark auf die Chromatographie aus. Die Monomere eluieren im Bereich eines 52 kDa großen Proteins. Das native Dimer eluiert ebenfalls in diesem Bereich. Unter Aufreinigungsbedingungen (2 mol·l⁻¹ Gnd-HCl) verhält sich das Monomer wie natives BSA, obwohl sich die beiden Proteine um den Faktor 5,5 in ihren molaren Massen unterscheiden. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Ausnutzung des zur Verfügung stehenden Porenvolumens (Abschnitt 4.3.3).

4.6.5 Biologischer Aktivitätstest

Die Analyse der biologischen Aktivität eines rekombinant hergestellten und aus Einschlußkörpern isolierten Proteins ist ein sehr wichtiger Aspekt. Während bei vielen Proteinen die enzymatische Aktivität einfach und quantitativ über den Umsatz eines Substrates photometrisch verfolgt werden kann, ist dies bei Proteinen mit Signalübertragungseigenschaften nur in aufwendigen Untersuchungen und nur qualitativ möglich. Wachstumsfaktoren wie PDGF stimulieren die Zellteilung, die einerseits direkt über Proliferationstests (Bestimmung der Zellzahl) oder andererseits indirekt über die DNA-Synthese mittels Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin nachgewiesen werden kann. Letzere Methode wurde für PDGF-AB angewendet (Abschnitt 3.9.2). PDGF-AB wurde im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 40 ng·ml⁻¹ zu konfluenten und ausgehungerten 3T3- Embryonalzellen der Balb/c-Maus gegeben (Endkonzentration). Nach Zusatz von ³H-Thymidin und Inkubation über 36 - 48 h wurden die Zellen aufgearbeitet und die Radioaktivität gemessen. Abb. 4.29 zeigt die Ergebnisse für PDGF aus Eigenherstellung und kommerziell erhältlichem PDGF.

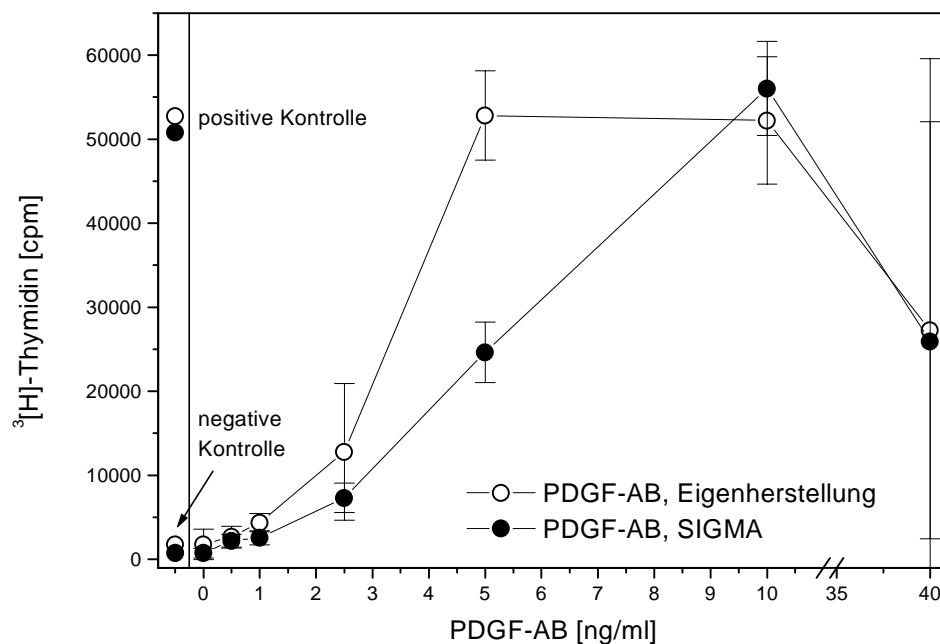


Abb. 4.29: Untersuchung der biologischen Aktivität von PDGF-AB durch Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin. Vergleich von PDGF-AB aus Eigenherstellung und kommerziell erhältlichem PDGF-AB (SIGMA P6684). Negative Kontrolle: Phosphat-gepufferte physiologische NaCl-Lösung (PBS); positive Kontrolle: 20 %iges Kälberserum.

Beide Kurven zeigen im Bereich von $0,5$ bis $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ einen starken Anstieg der gemessenen Radioaktivität. Im Falle von PDGF-AB aus Eigenherstellung erreicht die Radioaktivität einen konstanten maximalen Wert zwischen 5 und $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Der um etwa die Hälfte geringere Wert bei $40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ist der Mittelwert dreier stark differierender Einzelmeßwerte, so daß dieser Meßpunkt nur wenig Aussagekraft besitzt. Allerdings wurde ein Rückgang der DNA-Syntheseaktivität bzw. der gemessenen Radioaktivität zu höheren Konzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren häufig gefunden (Hoppe et al., 1990; Weich, 1997). Eine charakteristische Größe der Beurteilung der mitogenen Aktivität ist die Bestimmung der halbmaximalen Stimulierung. Darunter versteht man die Konzentration des Wachstumsfaktors, bei der die Stimulierung der Zellteilung halbmaximal ist. Dieser Wert liegt für PDGF-AB aus Eigenherstellung bei etwa $3,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, während für das kommerziell erhältliche PDGF-AB (SIGMA) eine halbmaximale Stimulierung bei $5,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ gefunden wurde. In der Literatur wird die halbmaximale Stimulierung von PDGF-AB zu $3 - 5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ angegeben (Hoppe et al., 1990; Schöllmann et al., 1992; Jaumann, 1992). Dies gilt für

verschiedene Zelltypen, darunter auch 3T3-Embryonalzellen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit kann somit festgestellt werden, daß die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Produktion und besonders zur Renaturierung von PDGF-AB biologisch aktives Material liefert, das sich in dieser Hinsicht nicht von kommerziellem PDGF-AB unterscheidet.

4.6.6 MALDI-Massenspektrometrie

Die matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisierung ist eine vergleichsweise milde Ionisierungsmethode, die auch die Analyse von Makromolekülen im allgemeinen ohne Fragmentierung erlaubt. Allerdings ist die eingebrachte Energie häufig so groß, daß photochemische Reaktionen zu Oligomeren auftreten können, die ein Vielfaches der molaren Masse des zu analysierenden Makromoleküls aufweisen. Abb. 4.30 zeigt das Massenspektrum von PDGF-AB. Der Peak bei einem Masse zu Ladungs-Verhältnis ($m \cdot z^{-1}$) von 24807 entspricht dabei dem einfach ionisierten Heterodimer PDGF-AB. Das zweifach geladene Molekülion ist bei $m \cdot z^{-1} = 12405$ zu sehen. Diese Spezies wird zu

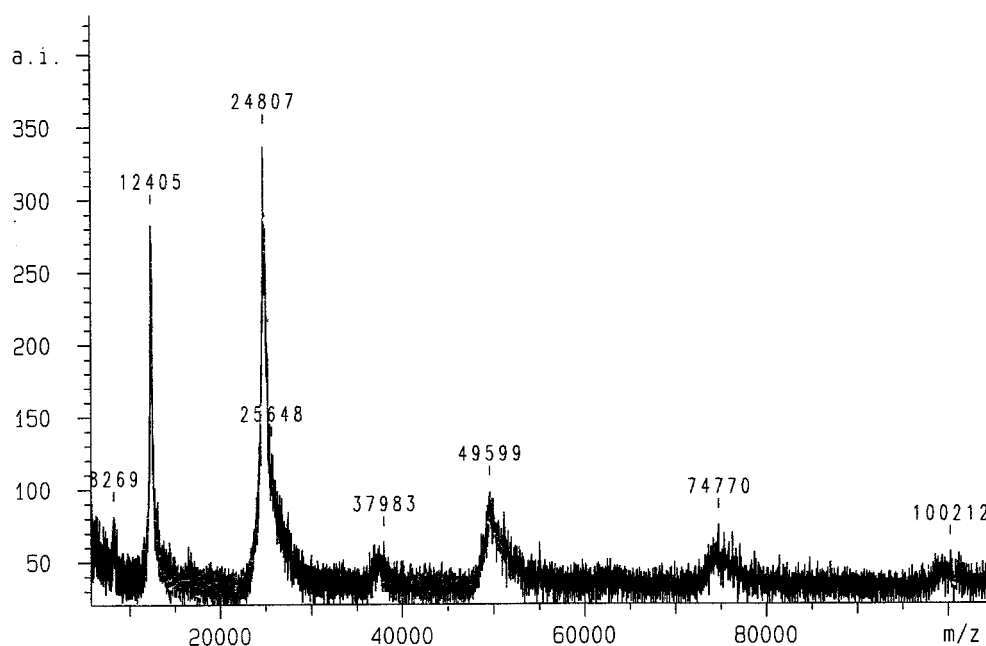


Abb. 4.30: MALDI-Massenspektrum von biologisch aktivem PDGF-AB. PDGF-AB: $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); Puffer: $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Ammoniumacetat pH 7,0; Beladung: $1 \mu\text{l}$; Matrix: Sinapinsäure; Ionisierung mit Stickstofflaser $\lambda_{\text{exc.}} = 337 \text{ nm}$.

einem gewissen Ausmaß bei jeder massenspektrometrischen Untersuchung gefunden. Zudem ist vermutlich auch ein kleiner Anteil PDGF-Monomere aufgrund der Labilität von Disulfidverbrückungen im MALDI-Prozeß mitverantwortlich für das Auftreten dieses Peaks (Tannhauser et al., 1997). Die Peaks bei größeren Masse zu Ladungsverhältnissen sind auf die bereits erwähnten photochemischen Oligomerisierungsreaktionen zurückzuführen. Weiterhin auffällig ist die breite Basis des PDGF-AB-Peaks von etwa $m \cdot z^{-1} = 23000$ bis 30000 . Die N-terminale Sequenzierung ergab eindeutig die PDGF-Sequenz der A- und B-Kette ohne Nebensequenzen, die auf eine Verunreinigung mit einer ähnlichen molaren Masse schließen lassen könnte. Die beiden Homodimere, die bei der Renaturierung ebenfalls gebildet werden (Abschnitt 4.2.3), sind nur zum Teil mitverantwortlich für die breite Peakbasis. Kovalente Addukte der nur über eine Disulfidbrücke verbundenen Monomere mit Glutathion können eine Quelle für Heterogenitäten der Probe sein (Rüdiger, 1997; Tannhauser et al., 1997). Eine zuverlässige Möglichkeit, den Dimerisierungsprozeß über die Bildung der intermolekularen Disulfidverbrückungen mittels MALDI-Massenspektrometrie zu verfolgen, ist nicht gegeben, da die Signalintensität von der molaren Masse der Probenmoleküle abhängig ist und die photochemische Reaktion zu Dimeren eine quantitative Analyse zusätzlich erschwert.

4.6.7 Untersuchung auf Endotoxine

Die Quantifizierung der freien und an PDGF-AB komplexierten (maskierten) Endotoxine wurde mit dem LAL-Test (Abschnitt 3.9.3) durchgeführt. PDGF-AB wurde dazu in einer Konzentration von $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ eingesetzt. Folgende Endotoxinkonzentrationen wurden erhalten:

freies Endotoxin: 6 Einheiten pro ml ($0,6 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)

komplexiertes Endotoxin: 34 Einheiten pro ml ($3,4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Diese Werte sind sehr niedrig. Bedenkt man, daß Endotoxine negative Ladungen tragen, die Feinreinigung von PDGF jedoch über die kationenaustauschenden Eigenschaften von Heparin durchgeführt wurde, so ist davon auszugehen, daß der größte Teil der Endotoxine bei diesem Reinigungsschritt abgetrennt wurde. In dieser

Weise läßt sich auch die Affinität zur Komplexbildung mit dem basischen PDGF interpretieren, die dazu führt, daß nach der Demaskierung eine höhere Endotoxinkonzentration resultiert.

Die Applikation von PDGF in den klinischen Studien erfolgt im µg-Bereich (Robson et al., 1992). Der zulässige Grenzwert von 5 Endotoxineinheiten (entsprechend 0,5 ng) pro kg Körpergewicht (Müller-Calgan, 1989) wird daher weit unterschritten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Verfahren zur Renaturierung des dimeren Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF, platelet-derived growth factor) entwickelt. Dieses Protein ist aufgrund seiner hohen mitogenen Aktivität für verschiedene Zelltypen besonders zur Therapie nicht heilender Wunden in der Humanmedizin zunehmend von Bedeutung.

Die rekombinante Produktion mit dem thermisch induzierbaren pCytexP3-pBS/PDGF-BA2-Vektor liefert ausschließlich nicht biologisch aktives unlösliches Protein, das in Form von Einschlusskörpern in den Zellen abgelagert wird. Durch Verwendung des an der GBF entwickelten Hochzelldichteverfahrens konnte eine Zelldichte von $81 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Biotrockenmasse mit einem PDGF-A/B - Gehalt von $0,75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erhalten werden (ca. 1,5 % des Gesamtproteins).

Der kritische Schritt der nachfolgenden Aufarbeitung war die Renaturierung von PDGF zur biologisch aktiven Spezies. Dazu wurden die Einschlusskörper zunächst mit dem stark chaotropen Reagenz Guanidinium-Hydrochlorid in Lösung gebracht. Daraufhin erfolgte eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mittels Gelfiltration, die PDGF zu über 90 % rein lieferte. Die klassische Methode zur Renaturierung von Proteinen besteht in der Verdünnung des chaotropen Reagenzes zur Schaffung von Bedingungen, die eine Faltung zum biologisch aktiven Protein zulässt. Dabei treten konzentrationsabhängige, zur Faltung kinetisch konkurrierende Aggregationsreaktionen auf, die die Ausbeute drastisch reduzieren können. Im Falle von PDGF wurde sogar für geringe Proteinkonzentrationen ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $0,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) der Anteil der Aggregatbildung mit Hilfe fluoreszenzspektrometrischer Daten zu 50 % bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entwicklung einer Renaturierungsmethode auf Basis der Gelfiltration, wobei eine Gesamtausbeute an nativem Protein von bis zu 76 % erreicht wurde. Die Gelfiltration lieferte monomere Faltungsintermediate, die nach

ihrer Elution zum biologisch aktiven Dimer reagierten. Dies konnte mit der Methode der irreversiblen Blockierung der intermolekularen Thiolgruppen durch Iodessigsäure und nachfolgender SDS-PAGE-Analyse gezeigt werden. Dabei konnten $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($0,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) vollständig denaturiertes und reduziertes PDGF-A/B für die Gelfiltration eingesetzt werden. Das Ausmaß an Aggregation lag deutlich unter 10 %. Die Natur des Gelfiltrationsprozesses ist entscheidend an dieser verminderten Aggregatbildung beteiligt. Die Anwesenheit von $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Guanidinium-Hydrochlorid während der Gelfiltration erwies sich als günstig sowohl für die Minimierung der Aggregation als auch zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption von PDGF an die Gelmatrix. Neben der erfolgreichen Minimierung der Aggregation mit dieser Methode findet gleichzeitig auch eine Abtrennung der Aggregate statt, die als hochmolekulare Spezies die Poren der Gelmatrix weniger effektiv nutzen können und somit zuerst eluieren. Das entwickelte Verfahren zur Renaturierung von PDGF ließ sich auch erfolgreich bei stark verunreinigtem Ausgangsmaterial anwenden.

Die kinetische Analyse der Dimerisierungsreaktion mit der Blockierungsmethode lieferte eine Reaktionsordnung von 1 für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wobei die Geschwindigkeitskonstante k_1 zu $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ berechnet wurde. Dieser Sachverhalt wurde aus der Unabhängigkeit des Monomerumsatzes und der graphisch bestimmten Halbwertszeiten bei verschiedenen Monomeranfangskonzentrationen im Bereich von $1,9$ bis $47 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (entsprechend 24 bis $584 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie mit Hilfe der Differentialmethode abgeleitet. Aus dem experimentellen Befund, daß die Heterodimerisierung zu PDGF-AB etwa dreimal so schnell wie die Homodimerisierung (zu PDGF-AA bzw. -BB) verläuft, wurde gefolgert, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt aus einer Konformationsänderung auf der Ebene der bereits assoziierten, jedoch noch nicht kovalent verbundenen Monomere besteht.

Die Dimerisierung konnte aufgrund des fluoreszenzlöschenden Effektes der sich bildenden intermolekularen Disulfidbrücken in der nahen Umgebung des Tryptophanrestes mittels Fluoreszenzspektrometrie ebenfalls verfolgt werden. Die resultierende Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung stimmte mit $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ sehr gut mit der durch SDS-PAGE ermittelten überein. Somit lieferten zwei unabhängige Analyseverfahren konsistente Daten zur Dimerisierung von PDGF.

Der bei sämtlichen eingestellten Umgebungsbedingungen gefundene unvollständige Monomerumsatz konnte unter Annahme der Bildung unkorrekt gefalteter Monomere bzw. Dimere in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten simuliert werden. Dabei wurde eine irreversible Parallelreaktion erster Ordnung zugrundegelegt.

Die Charakterisierung von PDGF-AB konnte die Authentizität des rekombinant hergestellten Proteins belegen. Die N-terminale Sequenzierung lieferte einen korrekten, homogenen N-Terminus. Die biologische Aktivität wurde indirekt über die Stimulierung der DNA-Synthese durch Einbau radioaktiv markierten ^3H -Thymidins bestimmt und zeigte die gleiche halbmaximale Stimulierung von etwa $3 - 5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ wie kommerziell erhältliches PDGF-AB. Mittels MALDI-Massenspektrometrie und zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden Heterogenitäten der PDGF-Probe festgestellt, die möglicherweise auf kovalent gebundenes Glutathion bzw. einen heterogenen C-Terminus zurückgeführt werden können.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß das entwickelte Renaturierungsverfahren für PDGF auf der Basis der Gelfiltration außerordentlich effektiv bezüglich der Minimierung der Aggregation ist und dadurch hohe Ausbeuten an aktivem Protein bei gleichzeitigem Einsatz hoher Proteinkonzentrationen ermöglicht. Zudem ist es auf andere Proteine übertragbar.

6. Literatur

ALEXANDER, D.M.; HESSON, T.; MANNARINO, A.; CABLE, M.; DALIE, B.L.: Isolation and purification of a biologically active human platelet-derived growth factor BB expressed in *Escherichia coli*; Protein Expression Purif. **3**, 204-211, (1992)

ANDERSSON, M.; ÖSTMAN, A.; KREYSING, J.; BACKSTROM, G.; DEN POLL, M. VAN; HELDIN, C.H.: Involvement of loop 2 of platelet-derived growth factor-AA and -BB in receptor binding; Growth Factors **12**, 159-164, (1995)

ANICETTI, V.R.; KEYT, B.A.; HANCOCK, W.S.: Purity analysis of protein pharmaceuticals produced by recombinant DNA technology; Trends Biotechnol. **7**, 342-349, (1989)

ANSPACH, F.B.; GBF Braunschweig; persönliche Mitteilung 1998

ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D.; STILES, C.D.: Purification of human platelet-derived growth factor; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 1809-1813, (1979)

ANTONIADES, H.N.; PANTAZIS, P.: Platelet-derived growth factor: Purification and characterization; Meth. Enzymol. **169**, 210-224; (1989)

ATHALYE, A.M.; GIBBS, S.J.; LIGHTFOOT, E.N.: Predictability of chromatographic protein separations: Study of size-exclusion media with narrow particle size distributions; J. Chromatogr. **589**, 71-85, (1992)

BAKER, D.; AGARD, D.A.: Kinetics versus thermodynamics in protein folding; Biochemistry **33**, 7505-7509, (1994)

BATAS, B.; CHAUDHURI, J.B.: Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography; *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 16-23, (1996)

BATAS, B.; JONES, H.R.; CHAUDHURI, J.B.: Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography; *J. Chromatogr. A* **766**, 109-119, (1997)

BETSHOLTZ, C.; JOHANSSON, A.; HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B.; LIND, P.; URDEA, M.S.; EDDY, R.; SHOWS, T.B.; PHILPOTT, K.; MELLOR, A.L.; KNOTT, T.J.; SCOTT, J.: cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines; *Nature* **320**, 695-699, (1986)

BUCHNER, J.; RUDOLPH, R.: Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab -fragments produced in *Escherichia coli*; *Bio/Technology* **9**, 157-162, (1991)

BURNS, D.L.; SCHACHMANN, H.K.: Assembly of the catalytic trimers of aspartate transcarbamoylase from folded monomers; *J. Biol. Chem.* **257**, 8638-8647, (1982a)

BURNS, D.L.; SCHACHMANN, H.K.: Assembly of the catalytic trimers of aspartate transcarbamoylase from unfolded monomers; *J. Biol. Chem.* **257**, 8648-8654, (1982b)

CAPELLOS, C.; BIELSKI, B.H.J.: *Kinetic systems: Mathematical Description of chemical kinetics in solution*; Wiley Interscience (New York); 1972

CARLSSON, U.; JONSSON, B.H.: Folding of β -sheet proteins; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 482-487, (1995)

CHATRENET, B.; CHANG, J.Y.: The disulfide pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiments; *J. Biol. Chem.* **268**, 20988-20996, (1993)

CHAUDHURI, J.B.; BATAS, B.; GUISE, A.D.: Improving protein refolding yields by minimizing aggregation; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**, 495-505, (1996)

CHRISTENSEN, H.; PAIN, R.H.: The contribution of the molton globule model; aus: The mechanisms of protein folding; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), 1994

CLAESSON-WELSH, L.: Platelet-derived growth factor receptor signals; *J. Biol. Chem.* **269**, 32023-32026, (1994)

CLARK, A.C.; SINCLAIR, J.F.; BALDWIN, T.O.: Folding of bacterial luciferase involves a non-native heterodimeric intermediate in equilibrium with the native enzyme and the unfolded subunits; *J. Biol. Chem.* **268**, 10773-10779, (1993)

CLELAND, J.L.; WANG, D.I.C.: Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase B: Quasi-elastic light scattering analysis; *Biochemistry* **29**, 11072-11078, (1990)

CLELAND, J.L.; WANG, D.I.C.: Equilibrium association of a molton globule intermediate in the refolding of bovine carbonic anhydrase; aus: Protein refolding; De Bernardez-Clark, E.; Georgiou, G.; American Chemical Society (Washington), 1991

CLELAND, J.L.; WANG, D.I.C.: Transient association of the first intermediate during the refolding of bovine carbonic anhydrase B; *Biotechnol. Prog.* **8**, 97-103, (1992)

CONNORS, K.A.: Chemical kinetics. The study of reaction rates in solution; VCH Publishers Inc., 1990

CORBETT, R.J.T.; ROCHE, R.S.: Use of high-speed size-exclusion chromatography for the study of protein folding and stability; *Biochemistry* **23**, 1888-1894, (1984)

COWGILL, R.W.: Fluorescence and protein structure; XI. Fluorescence quenching by disulfide and sulfhydryl groups; *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 37-44, (1967)

CRAIG, S.; CLEMENTS, J.M.; COOK, A.L.; DRYDEN, D.T.F.; GREEN, D.R.; HEREMANS, K.; KIRWIN, P.M.; PRICE, M.J.; FALLON, A.: Characterization of the structure and conformation of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and proteinase-resistant mutants of PDGF-BB expressed in *Saccharomyces cerevisiae*; *Biochem. J.* **281**, 67-72, (1992)

CREIGHTON, T.E.: Intermediates in the refolding of reduced pancreatic trypsin inhibitor; *J. Mol. Biol.* **87**, 579-602, (1974)

CREIGHTON, T.E.: Protein folding; *Biochem. J.* **270**, 1-16, (1990)

CREIGHTON, T.E.: Disulphide bonds between cysteine residues; aus: *Protein structure; a practical approach*; Creighton, T.E.; IRL Press (Oxford), 1990

CREIGHTON, T.E.: Folding pathways elucidated using disulfide bonds; aus: *Protein folding*; Creighton, T.E.; Freeman (New York), 1992

CREIGHTON, T.E.; DARBY, N.J.; KEMMINK, J.: The roles of partly folded intermediates in protein folding; *Faseb J.* **10**, 110-118, (1996)

DARBY, N.; CREIGHTON, T.E.: Disulfide bonds in protein folding and stability; *Meth. Mol. Biol.* **40**, 219-252, (1995)

DATAR, R.V.; CARTWRIGHT, T.; ROSEN, C.G.: Process economics of animal cell and bacterial fermentations: A case study analysis of tissue plasminogen activator; *Bio/Technology* **11**, 349-356, (1993)

De BERNARDEZ-CLARK, E.; GEORGIU, G.: Inclusion Bodies and recovery of proteins from the aggregated state; aus: Protein refolding; De Bernardez-Clark, E., Georgiou, G.; American Chemical Society (Washington), 1991

De FELIPPIS, M.R.; ALTER, L.A.; PEKAR, A.H.; HAVEL, H.A.; BREMS, D.N.: Evidence for a self-associating equilibrium intermediate during folding of human growth hormone; *Biochemistry* **32**, 1555-1562, (1993)

DILL, K.A.; FIEBIG, K.M.; CHAN, H.S.: Cooperativity in protein-folding kinetics; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1942-1946, (1993)

DÖTSCH, V.; WIDER, G.; SIEGAL, G.; WÜTHRICH, K.: Interaction of urea with an unfolded protein. The DNA-binding domain of the 434-repressor; *FEBS Lett.* **366**, 6-10, (1995)

DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W.: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation; *Nucleic Acid Res.* **16**, 6127-6145, (1988)

DUTTA, S.; MAITI, N.R.; BHATTACHARYYA, D.: Reversible folding of UDP-galactose-4-epimerase from *Escherichia coli*; *Eur. J. Biochem.* **244**, 407-413, (1997)

EFTINK, M.R.; SHASTRY, M.C.R.: Fluorescence methods for studying kinetics of protein folding reactions; *Meth. Enzymol.* **278**, 258-286, (1997)

EICHNER, W.; JÄGER, V.; HERBST, D.; HAUSER, H.; HOPPE, J.: Large-scale preparation of recombinant platelet-derived growth factor AA secreted from baby hamster kidney cells; *Eur. J. Biochem.* **185**, 135-140, (1989)

ENFORS, S.O.: Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins; *Trends Biotechnol.* **10**, 310-315, (1992)

ERNST, S.; GARRO, O.A.; WINKLER, S.; VENKATARAMAN, G.; LANGER, R.; COONEY, C.L.; SASISEKHARAN, R.: Process simulation for recombinant protein production: Cost estimation and sensitivity analysis for Heparinase I expressed in *Escherichia coli*; Biotechnol. Bioeng. **53**, 575-582, (1997)

FINKELSTEIN, A.V.: Rate of β -structure formation in polypeptides; Proteins: Structure, Function and Genetics **9**, 23-27, (1991)

FISCHER, S; RUDOLPH, R.; MATTES, R.; European Patent Application; Patent No. 0 393 725 A 1, 1986

FISCHER, B.; PERRY, B.; SUMNER, I.; GOODENOUGH, P.: A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies; Protein Eng. **5**, 593-596, (1992)

FRECH, C.; SCHMID, F.X.: DsbA-mediated disulfide bond formation and catalyzed prolyl isomerization in oxidative protein folding; J. Biol. Chem. **270**, 5367-5374, (1995)

FRIDMAN, M.; AGUILAR, M.I.; HEARN, M.T.W.: High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. Comparative study of the equilibrium refolding of bovine, porcine and human growth hormone; J. Chromatogr. **512**, 57-75, (1990)

GARNICK, R.L.; SOLLI, N.J.; PAPA, P.A.: The role of quality control in biotechnology: An analytical perspective; Anal. Chem. **60**, 2546-2557, (1988)

GAUTHIER, M.; PATSTON, P.A.: Reactivation of C1-inhibitor polymers by denaturation and gel filtration chromatography; Anal. Biochem. **248**, 228-233, (1997)

GEISOW, M.J.: Characterizing recombinant proteins; Bio/Technology **9**, 921-924, (1991)

GILBERT, H.F.: Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange; Adv. Enzymol. **63**, 69-172, (1990)

GILBERT, H.F.: The formation of disulfide bonds; aus: The mechanisms of protein folding; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), 1994

GOLOUBINOFF, P.; GATENBY, A.A.; LORIMER, G.H.: Role of chaperonins in protein folding; aus: Protein refolding; De Bernardez-Clark, E.; Georgiou, G.; American Chemical Society (Washington), 1991

GRONENBORN, A.M.; CLORE, G.M.: Experimental support for the "hydrophobic zipper" hypothesis; Science **263**, 536, (1994)

HABENICHT, A.J.R.; SALBACH, P.; JANßEN-TIMMEN, U.; BLATTNER, C.; SCHETTLER, G.: Platelet-derived growth factor - a growth factor with an expanding role in health and disease; Klin. Wochenschrift **68**, 53-59, (1990)

HACKER, J.; OTT, M.; TSCHÄPE, H.: Das Problem der Pathogenität von *Escherichia coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie; BIOforum **14**, 150-157, (1991)

HAGEN, A.J.; HATTON, T.A.; WANG, D.I.C.: Protein refolding in reversed micelles; Biotechnol. Bioeng. **35**, 955-965, (1990)

HAMAKER, K.H.; LIU, J.; SEELY, R.J.; LADISCH, C.M.; LADISCH, M.R.: Chromatography for rapid buffer exchange and refolding of secretory protease inhibitor; Biotechnol. Prog. **12**, 184-189; (1996)

HAMMACHER, A.; HELLMANN, U.; JOHNSON, A.; ÖSTMAN, A.; GUNNARSSON, K.; WESTERMARK, B.; WASTESON, A.; HELDIN, C.H.: A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain; J. Biol. Chem. **263**, 16493-16498, (1988)

HANNINK, M.; DONOGHUE, D.J.: Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins; *Biochim. Biophys. Acta* **989**, 1-10, (1989)

HART, C.E.; BAILEY, M.; CURTIS, D.A.; OSBORN, S.; RAINES, E.; ROSS, R.; FORSTROM, J.W.: Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets; *Biochemistry* **29**, 166-172, (1990)

HELDIN, C.H.; JOHNSON, A.; EK, B.; WENNERGREN, S.; RÖNNSTRAND, L.; HAMMACHER, A.; FAULDERS, B.; WASTESON, A.; WESTERMARK, B.: Purification of human platelet-derived growth factor; *Meth. Enzymol.* **147**, 3-13, (1987)

HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B.: Platelet-Derived growth factor: Three isoforms and two receptor types; *Trends Genet.* **5**, 108-111, (1989)

HELDIN, C.-H.: Structural and functional studies on platelet-derived growth factor; *EMBO J.* **11**, 4251-4259, (1992)

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining; *Electrophoresis* **6**, 103-112, (1985)

HLODAN, R.; PAIN, R.H.: The folding and assembly pathway of tumor necrosis factor $\text{TNF}\alpha$, a globular trimeric protein; *Eur. J. Biochem.* **231**, 381-387, (1995)

HOLLEMAN, A.F.; WIBERG, E.: *Lehrbuch der anorganischen Chemie*; Walter de Gruyter (Berlin), 1985

HOLTZHAUER, M.: *Chromatographie*; aus: *Methoden in der Proteinanalytik*; Springer (Berlin), 1996

HOPPE, J.; WEICH, H.A.; EICHNER, W.: Preparation of biologically active platelet-derived growth factor type BB from a fusion protein expressed in *Escherichia coli*; Biochemistry **28**, 2956-2960, (1989)

HOPPE, J.; WEICH, H.A.; EICHNER, W.; TATJE, D.: Preparation of biologically active platelet-derived growth factor isoforms AA and AB; Preferential formation of AB heterodimers; Eur. J. Biochem. **187**, 207-214, (1990)

INUI, H.; KITAMI, Y.; TANI, M.; KONDO, T.; INAGAMI, T.: Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) α and β receptors in vascular smooth muscle cells; J. Biol. Chem. **269**, 30546-30552, (1994)

ISAACS, N.W.: Cystine knots; Curr. Opin. Struct. Biol. **5**, 391-395, (1995)

JAENICKE, R.; RUDOLPH, R.; HEIDER, I.: Quaternary structure, subunit activity, and in vitro association of porcine mitochondrial malic dehydrogenase; Biochemistry **18**, 1217-1223, (1979)

JAENICKE, R.; RUDOLPH, R.: Refolding and association of oligomeric proteins; Meth. in Enzymol. **131**, 218-250, (1986)

JAENICKE, R.; RUDOLPH, R.: Folding proteins; aus: Protein structure; a practical approach; Creighton, T.E.; IRL Press (Oxford), 1990

JAENICKE, R.: Protein folding: Local structures, domains, subunits, and assemblies; Biochemistry **30**, 3147-3161, (1991)

JAENICKE, R.: Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins; Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **348**, 97-105, (1995)

JAUMANN, M.; HOPPE, V.; TATJE, D.; EICHNER, W.; HOPPE, J.: On the structure of platelet-derived growth factor AA: C-terminal processing, epitopes, and characterization of cysteine residues; *Biochemistry* **30**, 3303-3309, (1991)

JAUMANN, M.: Zur Struktur des PDGF-A. Untersuchungen durch gezielte Mutagenese des rekombinanten Proteins; Dissertation Würzburg, (1992)

KÄRST, U.; MÜLLER, C.; RINAS, U.; WEICH, H.A.; ERDMANN, H.: Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Dimeren von rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren aus der Cysteinknoten-Familie sowie Verwendung der gewonnenen Dimere; Deutsche Patentanmeldung 197 48 734.3, (1997)

KANE, J.F.; HARTLEY, D.L.: Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*; *Trends Biotechnol.* **6**, 95-101, (1988)

KARPLUS, M.; WEAVER, D.L.: Protein folding dynamics; *Nature* **260**, 404-406, (1976)

KELLY, J.D.; RAINES, E.W.; ROSS, R.; MURRAY, M.J.: The B chain of PDGF alone is sufficient for mitogenesis; *EMBO J.* **4**, 3399-3405, (1985)

KENNEY, W.C.; HANIU, M.; HERMAN, A.C.; ARAKAWA, T.; COSTIGAN, V.J.; LARY, J.; YPHANTIS, D.A.; THOMASON, A.R.: Formation of mitogenically active PDGF-B dimer does not require interchain disulfide bonds; *J. Biol. Chem.* **269**, 12351-12359, (1994)

KIEFHABER, T.; RUDOLPH, R.; KOHLER, H.H.; BUCHNER, J.: Protein aggregation in vitro and in vivo: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation; *Bio/Technology* **9**, 825-829, (1991)

KIM, P.S.; BALDWIN, R.L.: Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding; *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 459-489, (1982)

KLAGSBRUN, M.; LANGER, R.; LEVENSON, R.; SMITH, S.; LILLEHEI, C.: The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondrocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage; Exp. Cell Res. **105**, 99-108, (1977)

KORZ, D.J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E.A.; DECKWER, W.D.: Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*; J. Biotechnol. **39**, 59-65, (1995)

KURLAND, C.; GALLANT, J.: Errors of heterologous protein expression; Curr. Opin. Biotechnol. **7**, 489-493, (1996)

KURNIK, R.T.; YU, A.W.; BLANK, G.S.; BURTON, A.R.; SMITH, D.; ATHALYE, A.M.; VAN REIS, R.: Buffer exchange using size exclusion chromatography, countercurrent dialysis, and tangential flow filtration: Models, development, and industrial application; Biotechnol. Bioeng. **45**, 149-157, (1995)

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature **227**, 680-685, (1970)

LIGHT, A.: Protein solubility, protein modifications and protein folding; BioTechniques **3**, 298-306, (1985)

LIN, W.J.; TRAUGH, J.A.: Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in *Escherichia coli*: Purification and characterization of the reconstituted holoenzyme; Protein Expression Purif. **4**, 256-264, (1993)

LYONS, D.E.; THOMASON, A.R.: Production of biologically active platelet- derived growth factor from high expression host cell systems; WO 08762, (1991)

MAACHUPALLI-REDDY, J.; KELLEY, B.D.; De BERNARDEZ-CLARK, E.: Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme; Biotechnol. Prog. **13**, 144-150, (1997)

MacARTHUR, M.W.; THORNTON, J.M.: Influence of proline residues on protein conformation; J. Mol. Biol. **218**, 397-412, (1991)

MACH, H.; MIDDAUGH, C.R.; LEWIS, R.V.: Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins; Anal. Biochem. **200**, 74-80, (1992)

MALHOTRA, M.; SAHAL, D.: Anomalous mobility of sulfitolysed proteins in SDS-PAGE; Int. J. Peptide Protein Res. **48**, 240-248, (1996)

MARSTON, F.A.O.: The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*; Biochem. J. **240**, 1-12, (1986)

MAYO, K.H.; BARKER, S.; KURANDA, M.J.; HUNT, A.J.; MYERS, J.A.; MAIONE, T.E.: Molton globule monomer to condensed dimer: Role of disulfide bonds in platelet factor-4 folding and subunit association; Biochemistry **31**, 12255-12265, (1992)

McCARTHY, J.E.G.; SCHNEPPE, B.: Multicistronische Expression rekombinanter Gene in Bakterienzellen; P 35092; 1993

McDONALD, N.Q.; HENDRICKSON, W.A: A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif; Cell **73**, 421-424, (1993)

MEYER-INGOLD, W.: Wound therapy: Growth factors as agents to promote healing; Trends Biotechnol. **11**, 387-392, (1993)

MEYER-INGOLD, W.; EICHNER, W.: Platelet-derived growth factor; Cell Biol. Int. **19**, 389-398, (1995)

MILLA, M.E.; SAUER, R.T.: P22 Arc repressor: Folding kinetics of a single-domain, dimeric protein; Biochemistry **33**, 1125-1133, (1994)

MÜLLER-CALGAN, H.: Der Limulustest in der pharmazeutischen Praxis; aus: Der Limulustest; Scheer, R.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1989)

MUKHOPADHYAY, A.: Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms; Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **56**, 61-109, (1997)

NALL, B.T.: Proline isomerization as a rate-limiting step; aus: Mechanisms of protein folding; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), 1994

NORMENAUSSCHUß WASSERWESEN,: Bestimmung von Phosphorverbindungen (D11); Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung Anionen (Gruppe D); DIN 38 405(D 11), 1-16, (1983)

NOZAKI, Y.: The preparation of guanidine hydrochloride; Meth. Enzymol. **26**, 43-50, (1972)

OEFNER, C.; D'ARCY, A.; WINKLER, F.K.; EGGIMANN, B.; HOSANG, M.: Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB; EMBO J. **11**, 3921-3926, (1992)

ÖSTMAN, A.; RALL, L.; HAMMACHER, A.; WORMSTEAD, M.A.; COIT, D.; VALENZUELA, P.; BETSHOLTZ, C.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C.H.: Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer; J. Biol. Chem. **263**, 16202-16208, (1988)

ÖSTMANN, A.; ANDERSSON, M.; HELLMANN, U.; HELDIN, C.H.: Identification of three amino acids in the platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain that are important for binding to the PDGF β -receptor; J. Biol. Chem. **266**, 10073-10077, (1991)

PAIN, R.H. (Hrsg.): Mechanisms of protein folding; Oxford University Press (New York), 1994

PECORARI, F.; P.MINARD; DESMADRIL, M.; YON, J.M.: Occurrence of transient multimeric species during the refolding of a monomeric protein; J. Biol. Chem. **271**, 5270-5276, (1996)

PETSCH, D.; DECKWER, W.-D.; ANSPACH, F.B.: Proteinase K digestion improves detection of endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate assay: Application for endotoxin removal from cationic proteins; Anal. Biochem., 1998, eingereicht zur Publikation

PHILO, J.S.; R.ROSENFELD; ARAKAWA, T.; WEN, J.; NARHI, L.O.: Refolding of brain-derived neurotrophic factor from guanidine hydrochloride: Kinetic trapping in a collapsed form which is incompetent for dimerization; Biochemistry **32**, 10812-10818, (1993)

PLOMER, J.J.; GAFNI, A.: Renaturation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* after denaturation in 4 M guanidine hydrochloride: kinetics of aggregation and reactivation; Biochim. Biophys. Acta **1163**, 89-96, (1993)

PÖTGENS, A.J.G.; LUBSEN, N.H.; VAN ALTENA, M.C.; VERMEULEN, R.; BAKKER, A.; SCHOENMAKERS, J.G.G.; RUITER, D.J.; DE WAAL, R.M.W.: Covalent dimerization of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from CYS to SER mutations; J. Biol. Chem. **269**, 32879-32885, (1994)

POTSCHKA, M.: Universal calibration of gel permeation chromatography and determination of molecular shape in solution; Anal. Biochem. **162**, 47-64, (1987)

PRAKASH, V.; LOUCHEUX, C.; SCHEUFELE, S.; GORBUNOFF, M.J.; TIMASHEFF, S.N.: Interactions of proteins with solvent components in 8 M urea; Arch. Biochem. Biophys. **210**, 455-464, (1981)

PRESTRELSKI, S.J.; ARAKAWA, T.; DUKER, K.; KENNEY, W.C.; NARHI, L.O.: The conformational stability of a non-covalent dimer of a platelet-derived growth factor-B mutant lacking the two cysteines involved in interchain disulfide bonds; *Int. J. Peptide Protein Res.* **44**, 357-363, (1994)

PRICE, N.C.: Assembly of multi-subunit structures; aus: *The mechanisms of protein folding*; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), 1994

PTITSYN, O.B.: The molton globule state; aus: *Protein folding*; Creighton, T.E.; Freeman (New York), 1992

RAINES, E.W.; ROSS, R.: Purification of human platelet-derived growth factor; *Meth. Enzymol.* **109**, 749-773, (1985)

REILAND, J: Gel filtration; *Meth. Enzymol.* **22**, 287-321, (1971)

RICHTER, S.; Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) sowie Untersuchungen zur Rückfaltung und Assoziation aus Inclusion bodies; Diplomarbeit TU Braunschweig 1997

RINAS, U.; GBF, Braunschweig; persönliche Mitteilung 1998

ROBSON, M.C.; PHILLIPS, L.G.; THOMASON, A.; ROBSON, L.E.; PIERCE, G.F.: Platelet-derived growth factor BB for treatment of chronic pressure ulcers; *The Lancet* **339**, 23-25, (1992)

ROSS, R.; RAINES, E.W.; BOWEN-POPE, D.F.: The biology of platelet-derived growth factor; *Cell* **46**, 155-169, (1986)

RÜDIGER, A.H.; GBF Braunschweig; persönliche Mitteilung 1997

RUDOLPH, R.; JAENICKE, R.: Kinetics of reassociation and reactivation of pig-muscle lactic dehydrogenase after acid dissociation; *Eur. J. Biochem.* **63**, 409-417, (1976)

RUDOLPH, R.; FUCHS, I: Influence of glutathione on the reactivation of enzymes containing cysteine or cystine; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **364**, 813-820, (1983)

RUDOLPH, R.; FUCHS, I.; JAENICKE, R.: Reassociation of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase is determined by slow and very slow folding reactions; Biochemistry **25**, 1662-1669, (1986)

RUDOLPH, R.: Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from "inclusion bodies"; aus: Modern methods in protein- and nucleic acid research; Tschesche, H.; Walter de Gruyter (Berlin-New York), 1990

RUDOLPH, R.; LILIE, H.: In vitro folding of inclusion body proteins; Faseb J. **10**, 49-56, (1996)

RUDOLPH, R.: Successful protein folding on an industrial scale; aus: Protein Engineering: Principles and Practice; Cleland, J.L.; Craik, C.S.; Wiley-Liss Inc., 1996

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.: Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York), 1989

SAWERS, G.; JARSCH, M.: Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*; Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**, 1-9, (1996)

SCHEIN, C.H.: Production of soluble recombinant proteins in bacteria; Bio/Technology **7**, 1141-1149, (1989)

SCHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M.: Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature; Bio/Technology **6**, 291-294, (1988)

SCHIFFER, C.A.; DÖTSCH, V.: The role of protein-solvent interactions in protein unfolding; Curr. Opin. Biotechnol. **7**, 428-432, (1996)

SCHMID, F.X.: Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins; aus: Protein folding; Creighton, T.E.; Freeman (New York), 1992

SCHNEPPE, B.; EICHNER, W.; MCCARTHY, J.E.G.: Translational regulation of a recombinant operon containing human platelet-derived growth factor (PDGF)-encoding genes in *Escherichia coli*: Genetic titration of the peptide chains of the heterodimer AB; Gene **143**, 201-209, (1994)

SCHÖLLMANN, C.; GRUGEL, R.; TATJE, D.; HOPPE, J.; FOLKMAN, J.; MARMÉ, D.; WEICH, H.A.: Basic fibroblast growth factor modulates the mitogenic potency of the platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms by specific upregulation of the PDGF a receptor in vascular smooth muscle cells; J. Biol. Chem. **267**, 18032-18039, (1992)

SCHWETLICK, K.; DUNKEN, H.; PRETZSCHNER, G.; SCHERZER, K.; TILLER, H.J.: Chemische Kinetik, 5. Auflage; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; Leipzig 1989

SECKLER, R.; JAENICKE, R.: Protein folding and protein refolding; Faseb J. **6**, 2545-2552, (1992)

SIEMEISTER, G.; SCHNURR, B.; MOHRS, K.; SCHÄCHTELE, C.; MARMÉ, D.; MARTINY-BARON, G.: Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*; Biochem. Biophys. Res. Comm. **222**, 249-255, (1996)

SINCLAIR, J.F.; WADDLE, J.J.; WADDILL, E.F.; BALDWIN, T.O.: Purified native subunits of bacterial luciferase are active in the bioluminescence reaction but fail to assemble into the alpha beta structure; Biochemistry **32**, 5036-5044, (1993)

SINHA, N.K.; LIGHT, A.: Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on agarose beads; J. Biol. Chem. **250**, 8624-8629, (1975)

SOMA, Y.; DVONCH, V.; GROTE, G.R.: Platelet-derived growth factor AA homodimer is the predominant isoform in human platelets and acute human wound fluid; *FASEB J.* **6**, 2996-3001, (1992)

STEMPFER, G.; HÖLL-NEUGEBAUER, B.; RUDOLPH, R.: Improved refolding of an immobilized fusion protein; *Nature Biotechnol.* **14**, 329-334, (1996)

SUN, P.D.; DAVIES, D.R.: The cystine-knot growth-factor superfamily; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 269-291, (1995)

SZABO, S.; KUSSTATSCHER, S.; SAKOULAS, G.; SANDOR, Z.; VINCZE, A.; JADUS, M.: Growth factors. New "endogenous drugs" for ulcer healing; *Scand. J. Gastroenterol.* **30**(Suppl. 210), 15-18, (1995)

TANNHAUSER, T.W.; ROTHWART, D.M.; SCHERAGA, H.A.: Kinetic studies of the regeneration of recombinant hirudin variant 1 with oxidized and reduced dithiothreitol; *Biochemistry* **36**, 2154-2165, (1997)

TAYLOR, G.; HOARE, M.; GRAY, D.R.; MARSTON, F.A.O.: Size and density of protein inclusion bodies; *Bio/Technology* **4**, 553-557, (1986)

TEIPEL, J.W.; KOSHLAND, D.E.: Kinetic aspects of conformational changes in proteins. II. Structural changes in renaturation of denatured proteins; *Biochemistry* **10**, 798-805, (1971)

THATCHER, D.R.; HITCHCOCK, A.: Protein folding in biotechnology; aus: The mechanisms of protein folding; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), 1994

THORNTON, J. M.: Protein structures - The end point of the folding pathway; aus: Protein folding; Creighton, T.E.; Freeman (New York), 1992

VARLEY, P.; GRONENBORN, A.M.; CHRISTENSEN, H.; WINGFIELD, P.T.; PAIN, R.H.; CLORE, G.M.: Kinetics of folding of the all- β sheet protein interleukin-1 β ; *Science* **260**, 1110-1113, (1993)

WEICH, H.A.; GBF Braunschweig; persönliche Mitteilung 1997

WELFLE, H.: Optische Spektroskopie; aus: Methoden der Proteinanalytik; Springer (Berlin), 1996

WERNER, M.H.; CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M.; A.KONDOH; FISHER, R.J.: Refolding proteins by gel filtration chromatography; *FEBS Lett.* **345**, 125-130, (1994)

WETLAUFER, D.B.; XIE, Y.: Control of aggregation in protein folding: A variety of surfactants promote renaturation of carbonic anhydrase II; *Protein Science* **4**, 1535-1543, (1995)

WISE, R.J.; ORKIN, S.H.; COLLINS, T.: Aberrant expression of platelet-derived growth factor A-chain cDNAs due to cryptic splicing of RNA transcripts in COS-1 cells; *Nucleic Acids Res.* **17**, 6591-6601, (1989)

WÜLFING, C.; PLÜCKTHUN, A.: Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*; *Mol. Microbiol.* **12**, 685-692, (1994)

ZARDENETA, G.; HOROWITZ, P.M.: Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding; *Anal. Biochem.* **223**, 1-6, (1994)

ZETTLMEISSL, G.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R.: Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation; *Biochemistry* **18**, 5567-5571, (1979)

ZETTLMEISSL, G.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R.: The yield of reactivation of lactic dehydrogenase after guanidine hydrochloride denaturation is not determined by proline cis-trans isomerization; *Eur. J. Biochemistry* **125**, 605-608, (1982)

ZETTLMEISSEL, G.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R.: Rate-determining folding and association reactions on the reconstitution pathway of porcine skeletal muscle lactic dehydrogenase after denaturation by guanidine hydrochloride; *Biochemistry* **21**, 3946-3950, (1982)

ZIEGLER, M.M.; GOLDBERG, M.E.; CHAFFOTTE, A.F.; BALDWIN, T.O.: Refolding of luciferase subunits from urea and assembly of the active heterodimer; *J. Biol. Chem.* **268**, 10760-10765, (1993)

7. Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole

7.1.1 Abkürzungen

AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrom
AU	absorption unit
bCAB	bovine Carboanhydrase
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bGH	bovine Growth Hormone
BHK	Baby Hamster Kidney
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
BSA	Bovines Serum Albumin
BTM	Biotrockenmasse
CHO	Chinese Hamster Ovary
cMDH	cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase
cpm	counts per minute
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
D', D''	dimere Intermediate
D _{unkorrekt}	unkorrekt gefaltetes Dimer
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FDA	Food and Drug Administration
Gnd-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form

I	Intermediat
IHF	Integration Host Factor
k. A.	keine Angabe
kDa	kilo-Dalton, Einheit für die molare Masse von Proteinen
LAL	Limulus-Amöbocyt-Lysattest
M*, M'	monomere Intermediate
MALDI	Matrix-assisted Laser-Desorption Ionization
mMDH	mitochondriale Malat-Dehydrogenase
M _{unkorrekt}	unkorrekt gefaltetes Monomer
N	natives, biologisch aktives Protein
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
ORD	Optische Rotationsdispersion
PBS	phosphate-buffered Saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGF-A/B	PDGF-Monomere A und B
PDGF-AB	PDGF-AB-Dimer
pLDH	porcine Lactat-Dehydrogenase
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
Pro	Prolin
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TNF α	Tumor necrosis factor α
TOF	Time of flight
tPA	tissue-Plasminogen-Aktivator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	ungefaltetes Protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
X-Pro	X bezeichnet die dem Prolin vorgeschaltete Aminosäure

7.1.2 Symbole

[A]	Konzentration der Komponente A	[mol·l ⁻¹]
[A] ₀	Anfangskonzentration der Komponente A	[mol·l ⁻¹]
[A] _t	Konzentration der Komponente A zur Zeit t	[mol·l ⁻¹]
B	Komponente B	[-]
Bq	Becquerel, Anzahl der radioaktiven Zerfälle	[1·s ⁻¹]
C _{Monomer}	Konzentration des Monomers	[mol·l ⁻¹]
E _A	Aktivierungsenergie	[J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
F	Präexponentieller Faktor	[s ⁻¹]
I ₀	Fluoreszenzintensität bei Reaktionsbeginn	[-]
I _t	Fluoreszenzintensität zur Zeit t	[-]
I _∞	Fluoreszenzintensität nach unendlicher Reaktionszeit	[-]
k ₋₁	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Rückreaktion	[s ⁻¹]
k ₁	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Hinreaktion	[s ⁻¹]
k ₂	Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung	[l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]
K ₂	scheinbare Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Aggregation	[l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]
K _d	Verteilungskoeffizient	[-]
n	Reaktionsordnung	[-]
[N]	Konzentration des nativen Proteins	[mol·l ⁻¹]
t	Zeit	[s]
T	Temperatur	[°C bzw. K]
U	Umsatz	[-, %]
V ₀	Ausschlußvolumen	[ml]
V _e	Elutionsvolumen des Analyten	[ml]
V _{gesamt}	geometrische Volumen der Gelpackung	[ml]
V _{Pore}	zur Verfügung stehendes Porenvolumen	[ml]
V _{P,e}	vom Analyten genutztes Porenvolumen	[ml]
V _{stationär}	Volumen der stationären Phase	[ml]
V _t	Gesamtvolumen der flüssigen Phase, bestimmt als Elutionsvolumen von Gnd-HCl	[ml]
X	Anzahl der Faltungsintermediate	[-]
y	Ausbeute des nativen Proteins	[-, %]

ϵ_0	Anteil der Partikelzwischenräume am geometrischen Gesamtvolumen	[-]
λ	Wellenlänge	[nm]
$\lambda_{\text{em.}}$	Emissionswellenlänge	[nm]
$\lambda_{\text{exc.}}$	Anregungswellenlänge	[nm]
λ_{max}	Wellenlänge des Intensitätsmaximums	[nm]
μ, μ_{set}	Wachstumsrate bzw. voreingestellte Wachstumsrate	[h ⁻¹]
ν_a, ν_b	stöchiometrische Koeffizienten der Komponenten A bzw. B	[-]
Σ	Summe	[-]

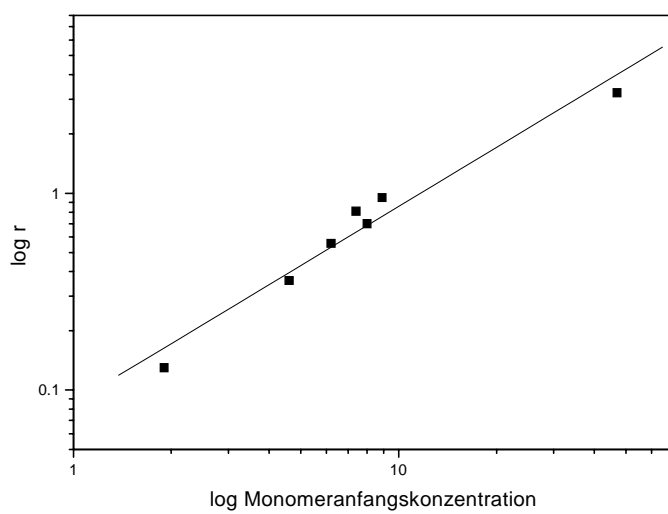
7.2 Tabellen

Tab. 7.1: Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* TG1 mit dem Vektor pCytexP3 pBS/PDGF-BA2 zur Produktion von PDGF-A/B

Zeit [h]	OD ₆₀₀	BTM [g·l ⁻¹]	PDGF-A/B [mg·l ⁻¹]	PDGF-A/B [mg·g ⁻¹ BTM]
0	0,1	0,55	--	--
2	0,283	0,7	--	--
8,5	5,771	3,8	--	--
10	12,715	7,15	--	--
11	20,983	11,2	--	--
11,75	30,7	14,85	--	--
12,25	30,2	15,15	--	--
13	34,4	16,9	--	--
14	37	18,1	--	--
15	44,5	20,75	--	--
16	50,1	24,1	--	--
17	56,2	27,25	--	--
18	61,2	31,65	--	--
19	68,5	36,7	--	--
20	79,5	40,45	--	--
21	81,5	44,3	--	--
22	92	50,25	--	--
22,5	93,5	54,4	--	--
22,75	INDUKTION			
23	92,25	56,75	187,45	3,3
24	107	55,65	252,25	4,53
25	118,25	62,45	384,97	6,16
26	125,75	64,1	556,74	8,69
27	128,25	65,45	561,51	8,58
28	136,75	70,85	680,9	9,61
29	145,25	75,05	641,46	8,55
30	140,25	77,45	646,69	8,35
31	158	81,25	869,21	10,7

Tab. 7.2: Bestimmung der Reaktionsordnung mit der Differentialmethode

$[M]_0$ [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	r [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]
47	3.243
8.9	0.95
8	0.7
7.4	0.81
6.2	0.556
4.6	0.36
1.9	0.13

**Abb. 7.1:** Bestimmung der Reaktionsordnung mit der Differentialmethode.

Tab. 7.3: Monomerumsatz für verschiedene Anfangskonzentrationen bei der Dimerisierung von PDGF-A/B (Bedingungen: 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,8; 0,5 mol·l⁻¹ Gnd-HCl; 10 mmol·l⁻¹ GSH; 0,25 mmol·l⁻¹ GSSG; T = 25°C)

Zeit [h]	Monomerumsatz [%] bei verschiedenen Anfangskonzentrationen [μmol·l ⁻¹]						
	1,9	4,6	6,2	7,4	8	8,9	47
0	0	0	0	0	0	0	0
1	6,9	7,9	8,9	10,9	8,8	10,7	6,9
2	14,8	18,6	17,6	25,4	19	24,8	18,7
3	21,8	26,9	25,3	32,7	24,6	31,1	25,1
4	26,4	33,1	32,1	36,3	32,5	36,2	32,6
5	32	36,8	38,9	40,7	35	44,3	40,6
6	36,6	40,4	44,9	48,6	47,9	48,2	49,2
8	43,2	44,3	49,9	49,6	50	52,8	54,3
10	50,1	47,9	54,8	57	52,8	56,5	59
12	60	52,5	57,2	58,1	56,5	59	65
15	53,4	57	60	63,7	61,2	61,8	65,9
20					60	63,3	62,4
21	55,3	60	61,4	65,5			
26	59,6	61,7		66,1			
30						65	60,4
31	60,2	64,1	64,5	67,4			
40						66,9	63
48	54,1	64,4	61,1	63,3			
50						64	66,6
60						63,3	61,4
80						63,7	61,9
96	8,7	63,9	63,8	63,9			

Tab. 7.4: Monomerumsatz für verschiedene Gnd-HCl-Konzentrationen bei der Dimerisierung von PDGF-A/B (Bedingungen: $110 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($8,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) PDGF-A/B; $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 25^\circ\text{C}$)

Zeit [h]	Monomerumsatz [%] bei verschiedenen Gnd-HCl-Konzentrationen [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]						
	0 *	0,25	0,5	0,8	1,0	1,2	1,5
0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	55,8						
0,5	69,2						
1	74,6	13,3	10,7	1,4	1,2	2,2	3,5
1,5	80,1						
2	86,2	32,3	24,8	3,1		3,6	8,5
3		37	31,1	5,9	1,6	6,7	
4	87,6	46,3	36,2	7,5	2,7	9,8	5,3
5		48,3	44,3		2,2	12,9	9,4
5,5				10,8			
6		57,5	48,2				
7				12,9			
8	90,3	57,7	52,8				
9				21,1			
10	90,4		56,5		9,9	13,5	12,1
15			61,8				
20			61,3				
21		71,3					
22,5					9,6	17	12,2
25		71,8					
30	93,4		65				
31					14,9	18	11,5
35				33,3			
40			66,9				
46		74,1					
50		73,2	64	38,2			
53					10,8	16,1	13,4
60			63,3				
74		72,1					
75				34,5			
78						19	13,7
80			63,7				
98		73,2		33,7			

* PDGF-A

Tab. 7.5: Monomerumsatz für verschiedene Redoxbedingungen bei der Dimerisierung von PDGF-A/B (Bedingungen: 92-110 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (7,4-8,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) PDGF-A/B; 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; 0,25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; T = 25°C)

Zeit [h]	Monomerumsatz [%] bei verschiedenen Redoxbedingungen			
	GSH; GSSG [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]; molares Verhältnis			
	10; 0,25; 40:1	5; 0,25; 20:1	5, 0,5; 10:1	5; 1; 5:1
0	0	0	0	0
1	10,7	9,7	12,7	3,2
2	24,8	16,4	20,2	8,7
3	31,1	25	30,6	13,1
4	36,2	37,1	37,1	13,9
5	44,3	40,5		23,5
6	48,2	43,6	44,6	26,9
7		45,5		
8	52,8	47,3	49,1	32,5
10	56,5	50,4	55,5	37,8
13			59,4	45,2
20	61,3		64,5	53,9
22		58,6		
25			67,3	56
30	65	60,3	72,6	54,5
35				59,4
40	66,9			
45			76,8	60,4
46		63,2		
50	64		74,4	54,8
54		63,5		
60	63,3		81	57,4
70		61,7		
80	63,7		87,6	57,4
100			90,5	
102		61,4		

Tab. 7.6: Monomerumsatz der verschiedenen PDGF-Isoformen bei der Dimerisierung (Bedingungen: PDGF-A: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); PDGF-A/B: $115 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($9,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); PDGF-B: $43 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 7,8; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSH; $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSSG; $T = 35^\circ\text{C}$)

Zeit [h]	Monomerumsatz [%] der verschiedenen PDGF-Isoformen		
	PDGF-A	PDGF-A/B	PDGF-B
0	0	0	0
0,33		7,7	
0,5			2,9
0,67		15	
0,75	2		
1		23	5,3
1,5		28,1	7,5
1,75	6,5		
2		33,5	11,4
2,25	8,7		
2,5		38,3	13,9
2,75	14		
3		40,6	15,8
3,25	19,5		
3,5		40,8	
3,75	21,6		
4		44,2	20,3
4,25	22,6		
4,5		47,6	
4,75	25,3		
5		50,2	26,6
6		49	33,73
7		51,7	
8	35,3		
9		53,8	
10			39,7
15	40,9	55,1	43,2
20	47,3	59,1	
25	49,9	59	
30	48,4		
38	51,9		
48	52,6		
100	52,3		51,3

Tab. 7.7a: Überprüfung der biologischen Aktivität von PDGF-AB aus Eigenherstellung (Abschnitt 3.9.2)

PDGF-AB [ng·ml ⁻¹]	cpm1	cpm2	cpm3	Mittelwert
0,5	1405	3882	2816	2702
1	3122	4911	5067	4367
2,5	3523	16074	18795	12797
5	54762	46799	56874	52812
10	52519	44533	59667	52240
40	9842	55681	16229	27251
neg. Kontrolle	3818	1167	347	1777
pos. Kontrolle	54235	48203	55767	52735

Tab. 7.7b: Überprüfung der biologischen Aktivität von kommerziellem PDGF-AB (SIGMA P6684)

PDGF-AB [ng·ml ⁻¹]	cpm1	cpm2	cpm3	Mittelwert
0,5	1426	2083	3024	2178
1	1775	2510	3443	2576
2,5	5307	8167	8466	7313
5	20789	25242	27896	24642
10	56883	50067	61156	56035
40	8161	64744	4869	25925
neg. Kontrolle	365	1368	466	733
pos. Kontrolle	57785	43774	50835	50798

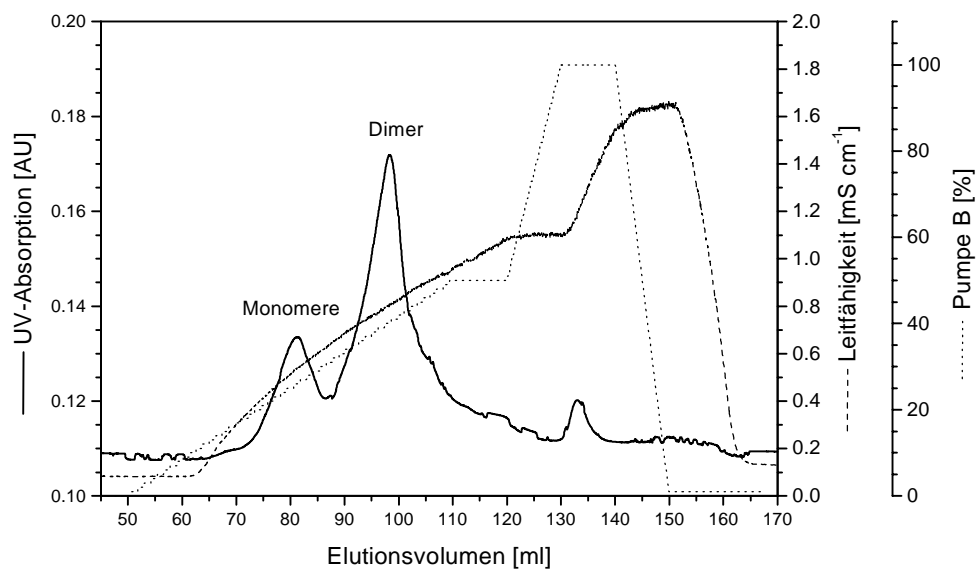


Abb. 7.2: Feinreinigung von PDGF-AB an Heparinsepharose. Eluent A: 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,0; Eluent B: 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,0; 2 mol·l⁻¹ NaCl; Flußrate: 1 ml·min⁻¹